

Inclusão de *Nannochloropsis oceanica* na alimentação de coelhos

Joana Patrícia Teixeira Bandarrinha

Dissertação para a obtenção de Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientadores:

- Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora associada com agregação aposentada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;
- Doutora Susana Paula Almeida Alves, Investigadora da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente - Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

- Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora associada com agregação aposentada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;
- Doutor José Pedro da Costa Cardoso Lemos, Professor associado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa;
- Doutor André Martinho de Almeida, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

A elaboração de uma dissertação requer muito trabalho e dedicação ao longo de todo o processo, por isso é essencial ter todo o apoio possível. Estou extremamente agradecida a todos os meus diversos e importantes apoios sem os quais não teria sido possível superar esta provação.

À Professora Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, por ter aceite ser minha orientadora, por me lançar este desafio, pela disponibilidade, pela amabilidade, pela amizade e sobretudo por nunca ter desistido de mim. Por todos os ensinamentos que me deu não só durante a realização deste trabalho como em todos os anos de formação.

À Doutora Susana Alves, por ter aceite ser minha coorientadora, por todos os ensinamentos e toda a sua disponibilidade durante a realização deste trabalho, em especial durante a parte experimental referente aos ácidos gordos.

À Engenheira Cátia Martins por toda a sua ajuda durante a realização da parte experimental deste trabalho e por ter sempre o laboratório disponível.

Ao David Ribeiro por toda a ajuda com os animais e à D. Georgina por toda a sua disponibilidade.

A todos os professores, quer do Instituto Superior de Agronomia, quer da Faculdade de Medicina Veterinária, pelo seu papel essencial ao longo de todo o meu percurso académico e por contribuírem para a minha formação.

A todas as pessoas que me ajudaram e me moldaram na pessoa que sou hoje. Em especial aos que ainda me conseguem aturar dando-me sempre a sua amizade e demonstrando a sua paciência, a quem este agradecimento é dirigido, sabê-lo-ão.

À Patrícia Gonçalves, por toda a tua amizade, por me proporcionares as maiores gargalhadas, por nunca desistires de mim, por partilhares as “desgraças” que se passam nas nossas vidas, por todas as palavras trocadas e por, basicamente, seres quem és.

À minha “menina”, Maude Closson, por estares sempre disponível quando preciso. Obrigada por todas as palavras de apoio e incentivo, pelo carinho e amizade. Sem dúvida que tudo isto teria sido mais difícil sem a tua presença na minha vida.

À minha família por todo o apoio incondicional que sempre me deram mas especialmente durante estes anos de formação, sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Aos meus sobrinhos, Mauro e Eva Gonçalves, pelas suas trapalhadas que conseguem sempre colocar um sorriso na minha cara.

E como os últimos são os últimos são sempre os primeiros, um obrigado especial aos meus pais, João e Graça, que fizeram sempre tudo para que eu seguisse este caminho com sucesso, por todo o seu apoio e educação dadas.

A todos vocês, um obrigado do fundo do coração!

Resumo

O trabalho experimental apresentado teve como objetivo estudar o efeito da inclusão da microalga *Nannochloropsis oceanica*, como substituta da soja integral na alimentação dos coelhos durante todo o período de engorda ou nos últimos 7 ou 14 dias que antecedem o abate nos resultados zootécnicos, na digestibilidade, no perfil de ácidos gordos da perna e nas diversas características da carne. Utilizaram-se quarenta coelhos, distribuídos por quatro grupos aos quais foram fornecidas dietas isoproteicas e isoenergéticas: controlo (SA), uma semana de microalga (A1), duas semanas de microalga (A2) e cinco semanas de microalga (AA).

A substituição da soja integral pela microalga não resultou em nenhum efeito significativo nos resultados zootécnicos.

O coeficiente de utilização digestiva (CUD) da gordura bruta foi superior ($P=0,001$) no grupo SA (78,8%) quando comparada com o grupo AA (75,2%). A digestibilidade aparente dos ácidos gordos 16:1 *cis*-9, 20:4 n-6, 20:5 n-3 foi estatisticamente superior ($P<0,001$) no grupo AA quando comparado com o grupo SA enquanto a digestibilidade do ácido gordo 20:0 foi superior ($P=0,001$) no grupo SA (73,48%) quando comparado com o grupo AA (66,12%).

O perfil de ácidos gordos da carne sofreu algumas alterações quando incluída a *Nannochloropsis oceanica*. Foi verificado um aumento significativo dos ácidos gordos 17:1 *cis*-9, 20:3 n-9, 20:5 n-3 e 22:5 n-3 e uma diminuição significativa do teor de ácidos gordos 20:0, 18:1 *cis*-9 e 20:1 *cis*-11 quanto maior o tempo de inclusão de microalga.

Nem a oxidação lipídica nem a cor da carne foram afetadas significativamente pela inclusão da microalga.

Em conclusão, a inclusão da microalga *Nannochloropsis oceanica* nas dietas de coelhos não afetou os parâmetros produtivos e da qualidade de carne. É possível no entanto com esta estratégia aumentar o teor em ácidos gordos polinsaturados de cadeia n-3.

Palavras-chave: coelho; *Nannochloropsis oceanica*; microalga; oxidação lipídica; ácidos gordos.

Abstract

The present experimental work had as objective to study the effect of the inclusion of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* as a substitute for whole soybean in rabbits feed during the whole fattening period or in the last 7 or 14 days before slaughter in the zootechnical results, digestibility, the fatty acid profile of the hind leg and the various characteristics of the meat. Forty rabbits were used, distributed in four groups to which isoproteic and isoenergetic diets were provided: control (SA), one week of microalgae (A1), two weeks of microalgae (A2) and five weeks of microalgae (AA).

The replacement of whole soybean with microalgae did not have any significant effect on zootechnical results.

The digestive utilization coefficient (CUD) of crude fat was higher ($P=0.001$) in the SA group (78.8%) when compared to the AA group (75.2%). The apparent digestibility of 16:1 *cis*-9, 20:4 n-6, 20:5 n-3 fatty acids was statistically higher ($P<0.001$) in group AA compared to group SA while the digestibility of fatty acid 20:0 was higher ($P=0.001$) in the SA group (73.48%) when compared to the AA group (66.12%).

The fatty acid profile of meat suffered some changes when *Nannochloropsis oceanica* was included. There was a significant increase in 17:1 *cis*-9, 20:3 n-9, 20:5 n-3 and 22: 5 n-3 fatty acids and a significant decrease in 20:0, 18:1 *cis*-9 and 20: 1 *cis*-11 fatty acid content the longer the microalgae inclusion time.

Neither lipid oxidation nor meat color were significantly affected by the inclusion of microalgae. In conclusion, the inclusion of microalgae *Nannochloropsis oceanica* in rabbit diets did not affect the production parameters and meat quality. However, it is possible with this strategy to increase the n-3 polyunsaturated fatty acid content.

Keywords: rabbit; *Nannochloropsis oceanica*; microalgae; lipid oxidation; fatty acids.

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo	V
Abstract.....	VI
Lista de figuras	IX
Lista de quadros	IX
Lista de abreviaturas	XI
Capítulo I – Introdução Geral	1
Capítulo II - Revisão bibliográfica.....	3
1 Algas	3
1.1 Macroalgas	3
1.2 Microalgas.....	8
2 Utilização de microalgas na alimentação animal.....	12
3 A carne de coelho.....	14
3.1 Qualidade da carne de coelho.....	14
3.2 Composição química da carne	16
4 Oxidação da carne.....	22
4.1 Oxidação lipídica.....	22
Capítulo III - Materiais e métodos	25
1. Delineamento experimental	25
1.1 Animais	25
1.2 Regimes alimentares.....	25
1.3 Colheitas	27
2. Análises químicas.....	28
2.1 Preparação de amostras	28
2.2 Determinação da matéria seca e da cinza.....	28
2.3 Determinação da proteína bruta	28
2.4 Determinação da gordura bruta.....	29
2.5 Determinação dos componentes fibrosos.....	29
2.6 Determinação do pH	30
2.7 Cor da carne	30
2.8 Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA).....	30
2.9 Perda de água por cozedura	31
2.10 Determinação dos ácidos gordos da carne.....	31
2.11 Determinação dos ácidos gordos dos regimes alimentares	32
2.12 Determinação dos ácidos gordos das fezes	33
3. Análise estatística.....	34

Capítulo IV - Resultados e discussão.....	35
1. Resultados zootécnicos	35
2. Digestibilidade fecal aparente	36
3. Digestibilidade aparente dos ácidos gordos.....	37
4. Parâmetros da carcaça de coelho e do desenvolvimento do trato digestivo	39
5. Composição química da carne.....	41
6. Perfil de ácidos gordos	42
7. Oxidação lipídica da carne.....	45
8. Perda de água por cozedura	46
9. Cor da carne.....	46
Capítulo V – Conclusões e considerações finais	48
Capítulo VI – Referências bibliográficas	49
Anexos.....	54
Anexo I	54

Lista de figuras

Figura 1 - Diferentes grupos de macroalgas. A- <i>Galaxaura rugosa</i> ; B- <i>Eucheuma cottonii</i> ; C- <i>Caulerpa racemosa</i> ; D- <i>Ulva lactuca</i> ; E - <i>Padina australis</i> ; F- <i>Turbinaria decurrens</i>	4
Figura 2 - Diferentes grupos de microalgas.....	8
Figura 3 - <i>Nannochloropsis</i> spp.	11
Figura 4 Evolução da produção da carne de coelho na Europa (em toneladas) (adaptado de FAOSTAT, 01/12/2018)	15
Figura 5 Esquema geral da oxidação lipídica (retirado de Silva et al., 1999).....	23

Lista de quadros

Quadro 1 Teor em proteína de algumas macroalgas (em % da matéria seca) (Adaptado de Harnedy e FitzGerald, 2011)	5
Quadro 2 Principais ácidos gordos de algumas macroalgas edíveis e alimentos (adaptado de Bocanegra et al., 2009)	7
Quadro 3 Habitat, produtos e aplicações de algumas microalgas. (Adaptado de Suda et al., 2002 e Rizwan et al., 2018)	9
Quadro 4 Composição química da carne de coelho, frango e peru, por cada 100g de carne fresca (adaptado de Cavani et al., 2009)	16
Quadro 5 Aminoácidos essenciais da carne de coelho, expresso em g/100g de carne fresca. (Adaptado de Combes, 2004)	17
Quadro 6 Conteúdo mineral da carne de coelho, porco, vaca, vitela e frango, expressa em mg/100g de carne fresca (adaptado de Dalle Zotte e Szendrő., 2011)	17
Quadro 7 Proporções relativas de diferentes tipos de ácidos gordos (em % do total de AG) e teor de colesterol (em mg/100g) dos lípidos intramusculares no longissimus dorsi (no peito em frango) (N- número de referências) (Adaptado de Dalle Zotte e Szendrő, 2011)	19
Quadro 8 Perfil de ácidos gordos de carne fresca de coelho, na carcaça e no músculo <i>Longissimus lumborum</i> . (CV- coeficiente de variação; n- número de valores retirados da bibliografia) (Adaptado de Combes, 2004)	21
Quadro 9 Composição centesimal (em %) dos regimes alimentares.....	26
Quadro 10 Composição química (% na Matéria seca) dos regimes alimentares	27
Quadro 11 - Composição em ácidos gordos (em g/100g de ácidos gordos totais) dos regimes alimentares. (n.d. – não detetado).	27
Quadro 12 Efeito da inclusão da <i>Nannochloropsis oceanica</i> nos regimes alimentares, com diferentes tempos de suplementação, na ingestão de alimento e no crescimento, desde o desmame até ao abate.....	36

Quadro 13 Efeito da presença de <i>Nannochloropsis oceanica</i> no coeficiente de utilização digestiva (em %) das várias frações da dieta, obtido a partir da recolha de fezes feita na 8ª semana de idade nos animais do grupo controlo (SA) e grupo alimentado com 4,45% de <i>Nannochloropsis oceanica</i> durante 5 semanas (AA).	37
Quadro 14 - Efeito da <i>Nannochloropsis oceanica</i> na quantidade ingerida, quantidade excretada (em mg/dia) e na digestibilidade (em %) dos ácidos gordos. (n.d. – não detetado)	39
Quadro 15 Efeito da <i>Nannochloropsis oceanica</i> nos parâmetros da carcaça de coelho..	40
Quadro 16 Efeito da <i>Nannochloropsis oceanica</i> nos parâmetros relativos ao sistema digestivo do coelho.....	41
Quadro 17 - Efeito da suplementação com <i>Nannochloropsis oceanica</i> nas diferentes frações (em % na matéria original) da carne da perna posterior de coelho	42
Quadro 18 Efeito da <i>Nannochloropsis oceanica</i> no perfil de ácidos gordos e dimetil acetais (DMA) (em % do total) da carne de coelho e no teor em ácidos gordos totais e DMA (em mg/g MS)) (n.d.- não detetado)	44
Quadro 19 Efeito da presença da <i>Nannochloropsis oceanica</i> na oxidação da carne (em mg MDA/ kg carne)	46
Quadro 20 Efeito da <i>Nannochloropsis oceanica</i> na perda de água da carne por cozedura (%)	46
Quadro 21 Efeito de <i>Nannochloropsis oceanica</i> na cor da carne a partir de amostras do Longissimus lumborum.....	47

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

A1	Dieta experimental com 4,45% de <i>Nannochloropsis oceanica</i> durante 2 semanas
A2	Dieta experimental com 4,45% de <i>Nannochloropsis oceanica</i> durante 1 semana
AA	Dieta experimental com 4,45% de <i>Nannochloropsis oceanica</i> durante 5 semanas
ADF	Fibra detergente ácido
ADL	Lenhina detergente ácido
AG	Ácidos gordos
ARA	Ácido araquidónico
CUD	Coeficiente de utilização digestiva
cv	Coeficiente de variação
DHA	Ácido docosahexaenóico
DMA	Dimetil acetais (do inglês <i>Dimethylacetamides</i>)
DPR	Desvio padrão residual
EGRAN	<i>European Group on Rabbit Nutrition</i>
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization Statistics</i>
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>gas chromatography</i>)
MDA	Malonaldeído
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados (do inglês <i>monounsaturated fatty acids</i>)
MS	Matéria seca
n	Número de observações
n-3	Ácidos gordos ómega 3
n-6	Ácidos gordos ómega 6
n.d	Não detetado
NDF	Fibra detergente neutro
NP	Norma portuguesa
PB	Proteína bruta
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados (do inglês <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
PV	Peso vivo
SA	Dieta experimental de controlo
SAS	<i>Statistical analysis systems</i> ®
SFA	Ácidos gordos saturados (do inglês <i>saturated fatty acids</i>)
spp	Espécies (do inglês <i>species</i>)
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>

Símbolos e unidades

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
cm	Centímetro
Co	Cobalto
Cu	Cobre
Fe	Ferro
g	Gramma
HCl	Ácido clorídrico
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Millilitro
mm	Milímetro
Mn	Manganês
Na ₂ SO ₄	Sulfato de anidro
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanómetros
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
Se	Selênio
UI	Unidades internacionais
Zn	Zinco

Capítulo I – Introdução Geral

A dieta tipicamente ocidental tem uma grande deficiência em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), em particular do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do ácido docosahexaenóico (DHA) (Lee et al., 2019). Estes podem ser sintetizados a partir do ácido α -linolénico (18:3 n-3), tanto em humanos como animais, no entanto a conversão do 18:3 n-3 em EPA e DHA não é muito eficiente, pelo que devem ser ingeridos através da alimentação para cumprir as recomendações nutricionais diárias destes PUFA (Spolaore et al., 2006). Os ácidos gordos com 20 a 22 átomos de carbono na sua constituição, como o EPA e o ácido araquidónico (ARA), são precursores de eicosanoides, como as prostaglandinas e os leucotrienos, com efeitos anti-inflamatórios e pró-inflamatórios, respetivamente. O DHA é muito importante no crescimento e desenvolvimento das funções cerebrais, assim como na manutenção da sua integridade (Martins et al., 2013).

A ingestão diária de 250 mg a 2 g de EPA e DHA pode prevenir doenças coronárias e doenças degenerativas associadas à idade e reduz o risco de episódios fatais associados à doença coronária (Martins et al., 2013).

As microalgas podem ser utilizadas para diversas funções, entre elas suplementação das dietas animais, uma vez que a biomassa destas microalgas fornece vitaminas, aminoácidos essenciais, polissacáridos, ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e PUFA, minerais e pigmentos. Das diversas microalgas utilizadas em aquacultura a espécie *Nannochloropsis* encontra-se entre as mais importantes (Madeira et al., 2017). Esta espécie é cultivada devido ao seu elevado teor de PUFA e, em especial, pela elevada concentração em EPA (Sandnes et al., 2005; Liu et al., 2017).

A carne de coelho tem algumas características que fazem dela nutricionalmente interessante. É uma carne magra com um baixo nível de colesterol, tem uma boa proporção de MUFA e PUFA, é uma boa fonte de vitamina B e tem um baixo teor de sódio. Pode, também, fornecer aos consumidores compostos bioativos, uma vez que os seus níveis de PUFA, DHA e EPA são facilmente elevados através da manipulação da alimentação (Dalle Zotte e Szendro, 2011).

Os lípidos presentes ou adicionados ao alimento tem um papel essencial no valor nutritivo e no desenvolvimento do sabor, no entanto quanto maior a presença de ácidos gordos, especialmente os PUFA, maior a possibilidade de ocorrência de oxidação lipídica, o que leva à deterioração da qualidade da carne (Mariutti e Bragagnolo, 2017).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da inclusão de *Nannochloropsis oceanica* como substituto da soja integral na alimentação de coelhos de engorda, durante o período de pós-desmame e crescimento. Para que isto fosse possível foram formulados dois regimes alimentares: um com soja integral e outro com *Nannochloropsis oceanica*, os regimes foram

oferecidos a quatro grupos de coelhos em diferentes períodos de tempo. Foram registados os resultados zootécnicos, determinou-se a digestibilidade das diferentes frações analíticas, analisou-se o desenvolvimento do trato digestivo, as características da carcaça e a qualidade da carne, tanto a nível do seu perfil de ácidos gordos como a nível de aparência.

Este trabalho inicia-se com uma introdução geral ao tema, seguidamente é apresentada uma revisão bibliográfica que refere questões importantes para um melhor entendimento do tema em questão, tais como: a caracterização das algas, macroalgas e microalgas e, mais concretamente, da microalga estudada, a *Nannochloropsis oceanica*; a utilização das microalgas em animais monogástricos; a caracterização da carne de coelho e, finalmente, a caracterização da oxidação lipídica da carne. Os restantes capítulos serão referentes ao trabalho experimental desenvolvido, aos resultados obtidos e discussão dos mesmos e, por último, às principais conclusões sobre este tema.

Capítulo II - Revisão bibliográfica

1 Algas

O termo algas é utilizado, de um modo geral, para caracterizar um grupo diverso de organismos fotossintéticos eucarióticos e procarióticos, que possuem características fisiológicas, morfológicas e genéticas diversas (Kumar et al., 2019). Existem dois tipos principais de algas, as macroalgas e as microalgas (Makkar et al., 2016).

Quando considerado o seu aspecto morfológico, as algas podem incluir desde organismos unicelulares microscópicos até organismos com um tamanho considerável, estando as de maiores dimensões incluídas no grupo das algas castanhas (Douglas et al., 2003).

As algas crescem mais rapidamente que as plantas terrestres uma vez que não possuem raízes, caule, folhas ou flores. São consideradas as plantas mais produtivas do mundo (Christaki et al., 2011)

As necessidades ambientais das algas variam amplamente de acordo com a espécie e com o local onde se encontram inseridas. Os principais parâmetros que influenciam o seu crescimento são a quantidade e a qualidade de nutrientes, a presença de luz, o pH, a turbulência, a salinidade e a temperatura (Hasan e Chakrabarti, 2009).

1.1 Macroalgas

As macroalgas (Figura 1) dividem-se em macroalgas castanhas (*Phaeophyceae*), macroalgas verdes (*Chlorophyceae*) e macroalgas vermelhas (*Rhodophyceae*), tendo variadas dimensões, formas, cores, composições e desenvolvendo-se em diferentes habitats. As macroalgas castanhas são, geralmente, as de maior tamanho, atingindo entre 35 a 45 metros, as macroalgas vermelhas têm uma cor rosa brilhante e podem ser encontradas até aos 100 metros de profundidade; por fim, as macroalgas verdes, que tem esta cor devido à presença de clorofila nos seus cloroplastos. Desenvolvem-se, geralmente, em locais onde existe luz abundante, tal como acontece em águas pouco profundas (Bocanegra et al., 2009; Makkar et al., 2016). O crescimento das macroalgas dá-se através da absorção de fósforo e compostos azotados, o que ajuda a reduzir a eutrofização e minimiza os custos e energia associados à suplementação de nutrientes (Bae et al., 2011).

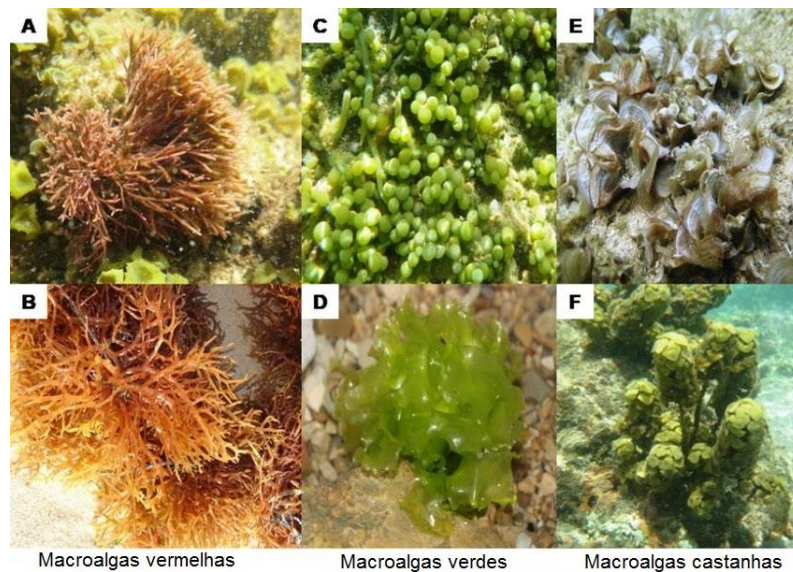


Figura 1 - Diferentes grupos de macroalgas. A- *Galaxaura rugosa*; B- *Eucheuma cottonii*; C- *Caulerpa racemosa*; D- *Ulva lactuca*; E - *Padina australis*; F- *Turbinaria decurrens*

Retirada de:

<https://www.researchgate.net/publication/329797284/figure/fig1/AS:705739760865280@1545272879752/Various-species-of-macroalgae-from-Indonesian-sea-water-Galaxaura-rugosa-A-Eucheuma.jpg>

As algas têm diversas utilizações, podendo ser utilizadas tanto para alimentação humana, como para medicina, sendo utilizados na indústria farmacêutica como por exemplo, no tratamento de deficiência de iodo ou como agentes hipocolesterolemicos e hipoglicêmicos. Podem também ser utilizadas como fertilizantes orgânicos e para alimentação animal (Jung et al., 2013; Makkar et al., 2016)

As macroalgas não necessitam nem de água doce nem de terra para serem cultivadas, têm uma eficiência fotossintética mais elevada que as plantas terrestres (6% a 8% e 1,8% a 2,2% respetivamente) e apresentam um risco mais baixo de competição por alimento e energia do que outras plantas mais utilizadas como o milho e o trigo (Jung et al., 2013).

Mundialmente existem cerca de mais de 20000 espécies de macroalgas, no entanto apenas cerca de uma dúzia é utilizada de forma comercial. Apesar desta diferença o cultivo mundial de macroalgas tem aumentado na última década a uma média de 10% por ano, sendo as macroalgas vermelhas e as macroalgas castanhas as mais cultivadas (Jung et al., 2013).

As principais macroalgas utilizadas para a alimentação animal são *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria spp.*, *Lithothamnion spp.*, *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum spp.*, *Palmaria palmata* e a *Ulva spp.* (Makkar et al., 2016).

Apesar de as macroalgas serem utilizadas desde há centenas de anos, durante a primeira metade do século 20 chegou-se ao consenso que tinham um valor nutritivo demasiado pobre para que fosse recomendado o seu uso na alimentação animal, mas o interesse nestes organismos foi renovado a partir dos anos sessenta (Makkar et al., 2016).

O teor de proteína das macroalgas varia entre 3% a 47% na matéria seca e dependendo da espécie, do filo, das condições ambientais e sazonais e do ciclo de vida. Geralmente este teor é mais elevado nas macroalgas vermelhas e nas macroalgas verdes (10% a 47% na matéria seca) do que nas macroalgas castanhas (3% a 16% na matéria seca) e as características organoléticas de todas estas algas é dada pelo seu perfil de aminoácidos livres, que por sua vez varia dependendo dos fatores ambientais onde são cultivadas (Bocanegra et al., 2009; Harnedy e FitzGerald, 2011). Em algumas espécies de macroalgas o teor de proteína pode ser equiparado com o de espécies vegetais como o da soja (Holdt e Kraan, 2011). O teor proteico de algumas macroalgas está apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 Teor em proteína de algumas macroalgas (em % da matéria seca) (Adaptado de Harnedy e FitzGerald, 2011)

Espécie de algas	Proteína
<i>Phaeophyta</i>	
<i>Undaria pinnatifida</i>	11– 24
<i>Laminaria saccharina</i>	6-11
<i>Fucus vesiculosus</i>	5-10
<i>Ascophyllum nodosum</i>	3-15
<i>Alaria esculenta</i>	9-20
<i>Himanthalia elongata</i>	6-11
<i>Rhodophyta</i>	
<i>Porphyra sp.</i>	24-50
<i>Porphyra tenera</i>	27-47
<i>Porphyra umbilicalis</i>	15-37
<i>Chondrus crispus</i>	11-20
<i>Palmaria palmata</i>	8-35
<i>Chlorophyta</i>	
<i>Ulva sp.</i>	15-25
<i>Ulva lactuca</i>	8-32
<i>Ulva pertusa</i>	17-26
<i>Ulva armoricana</i>	18-24
<i>Ulva rígida</i>	15-25
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	10-18

A composição em hidratos de carbono depende do tipo de macroalga, verificando-se que as macroalgas verdes contêm entre 25% a 50% de hidratos de carbono na matéria seca

enquanto as macroalgas vermelhas contêm entre 30% a 60% e as castanhas entre 30% a 50%. As macroalgas verdes têm os seus polissacáridos em proporções muito reduzidas, nas macroalgas vermelhas os polissacáridos principais são galactanos enquanto nas macroalgas castanhas o principal polissacárido é o ácido algínico (Jung et al., 2013). O teor de polissacáridos presentes nas diferentes macroalgas pode variar entre 4% e 76% na matéria seca (Holdt e Kraan, 2011).

O teor de lípidos das macroalgas é geralmente baixo encontrando-se entre 1% e 5% da matéria seca, sendo estes compostos essencialmente por ácidos gordos polinsaturados n-3 e n-6 (Makkar et al., 2016). O perfil de ácidos gordos tem uma proporção mais elevada de ácidos gordos saturados e insaturados do que o das plantas terrestres, sendo 20% a 50% do perfil de ácidos gordos constituído por ácidos gordos ómega-3 (Bocanegra et al., 2009). No Quadro 2 apresentam-se os principais ácidos gordos de algumas macroalgas edíveis em comparação com alguns alimentos mais tradicionais.

De um modo geral as macroalgas apresentam um teor mineral bastante variável, desde 8% a 40% na matéria seca, e relacionado com a capacidade das macroalgas de reter as substâncias inorgânicas marinhas. É assim variável entre espécies, de acordo com o tempo de vida em habitat marinho, com a exposição a ondas, com a localização geográfica, com a sazonalidade, com fatores ambientais e fisiológicos, com tipos de processamento e com métodos de mineralização utilizados. O conteúdo mineral é constituído principalmente por potássio, sódio, cálcio e magnésio (Bocanegra et al., 2009; Bae et al., 2011).

Embora as macroalgas sejam rotuladas de promotores de saúde, contêm metais em concentrações que podem ser tóxicas além conterem metais pesados, minerais e compostos bioativos que podem ter um efeito negativo na saúde (Holdt e Kraan, 2011).

Quadro 2 Principais ácidos gordos de algumas macroalgas edíveis e alimentos (adaptado de Bocanegra et al., 2009)

Alimentos	Ácidos gordos (g/100g de ácidos gordos totais)								
	Laúrico (12:0)	Mirístico (14:0)	Palmítico (16:0)	Esteárico (18:0)	Oleico (18:1c9)	Linoleico (18:2n-6)	Linolénico (18:3n-3)	Araquidónico (20:4n-6)	Eicosapentaenóico (20:5n-3)
<i>Porphyra</i> sp.	0,02-5,2	0,5-4,1	21,0-63,2	0,7-1,9	5,5-15,3	1,2-7,1	0,2-5,7	6,8-50,1	6,0-20,9
<i>U. pertusa</i>	-	0,7	29,2	-	44,5	9,8	1,1	0,9	-
<i>Laminaria</i> sp.	0,06	2,9-15,7	21,0-36,0	1,5	10,7-12,8	5,44-5,5	0,8-0,9	2,3-12,4	16,2
<i>U.</i> <i>pinnatifida</i>	-	2,3-3,2	13,5-16,5	0,7-0,9	6,0-6,8	6,2-7,4	11,2-12,0	13,3-15,9	9,4-13,2
<i>H.</i> <i>fusiforme</i>	-	0,3	26,8	0,8	7,7	3,6	0,4	5,3	42,4
Soja (branca)	-	0,2	9,9	3,5	23,3	57,0	5,4	0	0
Ovo	-	0,4	25,8	7,9	45,5	16,5	1,0	0,7	0

1.2 Microalgas

As microalgas (Figura 2) são, geralmente, organismos foto-autotróficos unicelulares ou multicelulares com um tamanho não superior a 400 μm , são bastante eficientes na conversão de energia solar não dependendo das condições ambientais externas e podem prosperar quer em água doce, água salgada ou água salobra (Altomonte et al., 2018; Kumar et al., 2019). Estas são classificadas em diátomos (*Bacillariophyceae*), algas verdes (*Chlorophyceae*), algas douradas (*Chrysophyceae*) e algas verde-azuladas ou cianobactérias (*Cyanophyceae*) (Madeira et al., 2017).

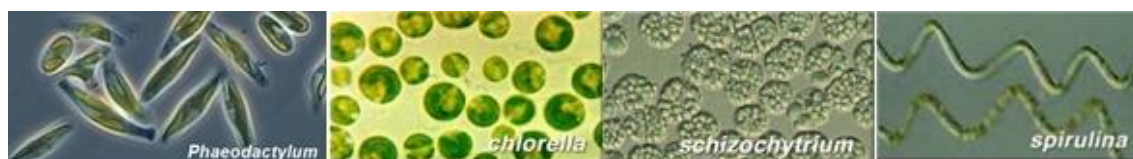


Figura 2 - Diferentes grupos de microalgas

Retirada de:

https://www.chemistryviews.org/SpringboardWebApp/userfiles/chem/image/2015/2015_12/Microalgae/microalgae_figure_1.jpg; <http://www.algaeindustrymagazine.com/wp-content/uploads/EightAlgae.jpg>

Quanto à sua utilização as microalgas podem ser utilizadas em particular para a produção de biodiesel. No entanto devido à presença de compostos fenólicos e compostos antioxidantes, podem ter aplicações na área farmacêutica ou na cosmética, como na indústria alimentar, devido aos seus compostos bioativos, na indústria química como fertilizante biológico e na alimentação animal (Altomonte et al., 2018; Rizwan et al., 2018; Kumar et al., 2019). No Quadro 3 apresenta-se o habitat, os produtos e aplicações de algumas microalgas.

Quadro 3 Habitat, produtos e aplicações de algumas microalgas. (Adaptado de Suda et al., 2002 e Rizwan et al., 2018)

Microalga	Água doce/salgada	Aplicação
<i>Aphanizomenon flosaquae</i>	Doce	Indústria alimentar
<i>Chlorella vulgaris</i>	Doce e salgada	Indústria alimentar e suplementos
<i>Dunaliella salina</i>	Salgada	Indústria alimentar
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Doce	Cosmética, indústria alimentar, alimentação animal e indústria farmacêutica
<i>Isochrysis galbana</i>	Salgada	Alimentação animal
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Salgada	Alimentação animal
<i>Parietochloris incise</i>	Doce	Indústria alimentar e indústria farmacêutica
<i>Porphyridium cruentum</i>	Doce	Indústria farmacêutica, cosmética e indústria alimentar
<i>Prototheca moriformis</i>	Doce/salgada	Indústria alimentar
<i>Spirulina platensis</i>	Doce	Indústria alimentar e cosmética

Comparativamente com as plantas terrestres utilizadas tradicionalmente na agricultura, as algas apresentam algumas vantagens. A principal vantagem das plantas é a de conseguirem reter o dióxido de carbono atmosférico excessivo e convertê-lo em oxigénio, ajudando desta maneira a reduzir o efeito de estufa. Além desta vantagem têm, também, uma maior produtividade que as plantas terrestres e podem prosperar em ambientes como desertos e áreas costeiras (Christaki et al., 2011).

As microalgas são constituídas por compostos de alto valor biológico como os ácidos gordos polinsaturados, proteínas, pigmentos, antioxidantes, vitaminas (A, B1, B2, B6 e C) e minerais, como o potássio, o cálcio e o magnésio (Christaki et al., 2011; Rizwan et al., 2018). A sua composição química pode, no entanto, variar amplamente dependendo do género, espécie e condições de crescimento. As microalgas são compostas por cerca de 39% a 71% de proteína, 10% a 57% de hidratos de carbono (principalmente polissacáridos como a celulose e o amido) e 6% a 86% de lípidos (principalmente esteróis e ácidos gordos polinsaturados de

cadeia longa) (Altomonte et al., 2018). Embora o teor de lípidos presentes nas microalgas possa variar e atingir os 70% da matéria seca, na maior parte das algas está entre os 20% e os 50% (Christaki et al., 2011).

Os lípidos presentes nas microalgas são particularmente valorizados na alimentação em aquacultura (Kumar et al., 2019).

Em termos de saúde humana é a presença de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA) que as torna especialmente interessantes. Estes ácidos gordos são ácidos gordos polinsaturados nutricionalmente significantes devido ao seu nível de bioatividade, são ácidos gordos polinsaturados que não são sintetizados pelos humanos e pelos animais em quantidades equivalentes às necessidades diárias e que, por isso, devem ser incluídos nas suas dietas. Além dos ácidos gordos polinsaturados DHA e EPA, as microalgas marinhas são ainda capazes de sintetizar ácido araquidónico (ARA) e ácido linolénico (Kumar et al., 2019; Christaki et al., 2011; Rizwan et al., 2018)

O teor proteico foi o motivo pelo qual se começou a cultivar as microalgas, podendo o perfil de aminoácidos (AA) de algumas microalgas ser comparável com o do ovo e da soja, nomeadamente o teor de lisina, metionina, triptofano, treonina, valina, histidina e isoleucina (Christaki et al., 2011). A qualidade da proteína produzida pela biomassa das microalgas é, em geral, superior à qualidade da proteína presente nos vegetais, no entanto é uma proteína com um valor biológico inferior à da proteína animal, nomeadamente do leite e da carne (Rizwan et al., 2018).

As microalgas contêm vários antioxidantes, como β -caroteno, astaxantina e outros carotenoides. Estes antioxidantes tem um efeito superior ao da vitamina E mas inferior aos antioxidantes sintéticos. Tendo em conta as preferências atuais dos consumidores para produtos naturais, os antioxidantes presentes nas microalgas poderão ser uma boa opção de modo a ir ao encontro a estas preferências. (Christaki et al., 2011).

A nível mundial 30% da produção de algas é utilizada na alimentação animal. Tendo em conta que as microalgas fazem parte do grupo dos produtores primários e contêm nutrientes nutricionalmente interessantes tem um papel essencial no crescimento e sobrevivência dos animais em aquacultura, tanto no seu estado larvar como no estado adulto. Neste tipo de produção animal, de um modo geral, as espécies de maior importância são as *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Skeletonema* e a *Thalassiosira*. A espécie *Spirulina* também é utilizada na alimentação de inúmeras espécies de animais, incluindo cães, gatos, bovinos, equinos e pássaros. A produção desta microalga é realizada, principalmente para a produção de suplementos em alimentação animal (Rizwan et al., 2018).

1.2.1 *Nannochloropsis oceanica*

A espécie *Nannochloropsis* (Figura 3) é uma microalga eucariótica marinha verde, que é extensivamente usada na indústria da aquacultura para alimentação tanto de zooplâncton, como de rotíferos, porém teve a sua utilização também reconhecida para as dietas humanas devido ao seu valor nutricional, sendo uma excelente fonte de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, devido à sua elevada produtividade de biomassa e alto teor de triglicéridos, e vitaminas (Marcilla et al., 2009; Xiao et al., 2013; Meng et al., 2015).



Figura 3 - *Nannochloropsis* spp.

Retirada de: <https://alchetron.com/cdn/nannochloropsis-28dd059f-445d-4e7d-8639-6e0c39c04cc-resize-750.jpeg>

Quanto à sua composição em hidratos de carbono o açúcar dominante é a glucose (Marcilla et al., 2009), e relativamente à composição em proteínas os aminoácidos dominantes são o aspartato, o glutamato e a proilina (Marcilla et al., 2009).

As microalgas sintetizam os ácidos gordos para formar vários tipos de lípidos. A *Nannochloropsis* é considerada uma espécie interessante como fonte de ácidos gordos, sendo os principais o ácido mirístico, o ácido palmítico, o ácido palmitoleico, o ácido oleico, o ácido araquidónico e o EPA como o mais abundante. Os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa como o EPA presente nesta microalga são importantes tanto para a saúde humana como para a saúde animal. O EPA é precursor de substâncias biologicamente ativas, como os eicosanóides, com propriedades anti-inflamatórias, e é importante para reduzir a concentração de colesterol e triglicéridos no sangue, na prevenção de doenças cardiovasculares, arteriosclerose, doenças de pele e artrite (Marcilla et al., 2009; Christaki et al., 2011; Meng et al., 2015; Liu et al., 2017).

A *Nannochloropsis oceanica* é utilizada em aquacultura na alimentação de moluscos bivalves, de crustáceos e de algumas espécies de peixes na fase larvar e juvenil e zooplâncton (Skrede et al., 2011).

Gatrell et al. (2015) utilizaram a biomassa de *Nannochloropsis oceanica* desengordurada, um subproduto de biocombustível, na incorporação de dietas para frangos, concluindo que a

utilização deste subproduto em níveis moderados (8%) era bem tolerado e não teria efeito negativo nas performances dos animais, mas níveis elevados de inclusão (16%) levavam a uma diminuição do ritmo de crescimento.

2 Utilização de microalgas na alimentação animal

Segundo Madeira et al. (2017) as microalgas são um importante recurso aquático e apesar de serem um grupo de organismos bastante heterogêneos as espécies fototróficas consideradas mais importantes são a *Spirulina*, a *Chlorella*, a *Dunaliella* e a *Haematococcus*. A incorporação de biomassa de microalgas na alimentação animal pode fornecer vitaminas, aminoácidos essenciais, polissacáridos, ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados n-3 e n-6, minerais e pigmentos.

O valor nutricional das microalgas utilizadas na alimentação animal é altamente variável uma vez que irá depender da composição química da microalga e da adaptação do animal ao alimento.

Uma vez que a parte experimental deste trabalho incide sobre a utilização de *Nannochloropsis oceanica* na alimentação do coelho de engorda e que existe escassez de informação quanto à utilização desta microalga recorrer-se-á a alguns resultados de utilização de outras microalgas na alimentação de monogástricos.

Num estudo conduzido por Peiretti e Meineri (2008) em 40 coelhos com 9 semanas e 2 kg em que foram fornecidas dietas com incorporações crescentes de *Spirulina platensis* (0%,5%,10% e 15%), não se verificou diferenças de eficiência alimentar entre grupos nem a ocorrência de mortalidade. O maior consumo do alimento registou-se no grupo com 10% de incorporação de *Spirulina* enquanto o menor consumo registou-se no grupo controlo (0% de incorporação). As digestibilidades da matéria seca, matéria orgânica, gordura bruta, energia, ADF e NDF decresceram significativamente com a incorporação da microalga, exceto no caso da proteína bruta cujo decréscimo de digestibilidade só foi significativo entre o regime controlo e o com 15% de incorporação de microalga. Grinstead et al. (2000) estudaram o efeito da *Spirulina platensis* como promotor de crescimento na alimentação de suínos em crescimento com uma incorporação de 0,2% a 2%, concluindo que as melhorias no crescimento obtidas pela incorporação desta microalga eram mínimas. Por outro lado Simkus et al. (2013), com o objetivo de avaliarem esta microalga como promotor de crescimento e melhoramento da qualidade da carne, observaram um aumento de peso mais rápido nos suínos suplementados com biomassa fresca de *Spirulina platensis* (0,2% de incorporação) sendo que o grupo controlo chegou aos 100 kg com cerca de 175 dias e o grupo suplementado com esta microalga com cerca de 168 dias. Verificou-se também, uma diferença significativa na quantidade de gordura intramuscular, em que os suínos suplementados apresentavam cerca

de 0,33% menos gordura intramuscular que os do grupo de controlo e uma diferença significativa no rendimento da carcaça, nos suínos suplementados registou-se um rendimento 2% mais elevado. Neste estudo não houve registo de diferenças significativas no pH, cor da carne, perda por cozedura e tenrura da carne. A utilização de *Spirulina platensis*, com uma incorporação de 0,5% a 1%, em 120 pintos do dia durante 42 dias estudada por Bonos et al. (2016) não registou diferenças significativas no peso vivo, no índice de conversão, na mortalidade e na oxidação lipídica. Não foram, também, registadas diferenças significativas nos ácidos gordos saturados (SFA), MUFA, PUFA, EPA e DHA da carne do peito, no entanto houve um aumento de PUFA, EPA e DHA na carne da coxa. Além destes resultados Evans et al. (2015) realizaram um ensaio com 6% a 21% de inclusão de *Spirulina platensis* e concluiu que é possível incluir até cerca de 16% desta microalga nas dietas de frangos sem causar efeitos negativos às suas *performances*.

No estudo conduzido por Yan et al. (2012) em 96 suínos em crescimento (26,6 kg) suplementados com 0,1% e 0,2% de *Chlorella vulgaris*, registou-se uma diferença significativa no aumento de peso médio diário e na digestibilidade de matéria seca superior aos do grupo de controlo, no entanto, este aumento poderá estar ligado ao uso de antibiótico uma vez que também ocorreu este aumento no grupo a que foi oferecido o alimento controlo mas com a adição do antibiótico. Num estudo realizado por Kang et al. (2013), que utilizaram 600 pintos do dia e uma incorporação de 1% de *Chlorella*, observou-se um aumento do peso vivo; o mesmo foi verificado por Oh et al. (2015), que utilizaram 300 patos do dia com uma incorporação de 0,1% a 0,2% de *Chlorella vulgaris*. Neste estudo observaram não só um aumento de peso dos patos como, também, um aumento de alimento ingerido, porém não houve diferenças significativas na eficiência alimentar. No estudo realizado por Oh et al. (2015) ocorreu, também, uma diferença significativa na cor da carne, na força de corte, no pH e na capacidade de retenção de água, todos estes parâmetros aumentaram com a suplementação. No estudo realizado por Rezvani et al. (2013), com 80 pintos do dia e uma incorporação crescente de *Chlorella vulgaris* (0,07%, 0,14% e 0,21%) apesar não ter ocorrido uma diferença significativa no aumento de peso dos frangos ocorreu uma diminuição do índice de conversão quando suplementados com a microalga.

Com a utilização de *Schizochytrium sp.*, com uma incorporação de 0,4% durante 56 dias, em coelhos em crescimento-engorda não foram registadas diferenças significativas no aumento de peso diário, no consumo diário de alimento, no índice de conversão, no peso vivo e no rendimento, mas observou-se um aumento de diversos ácidos gordos na carne proveniente do lombo, nomeadamente os ácidos gordos saturados como o mirístico, o palmítico e o esteárico, e os ácidos gordos insaturados, como o linolénico e o linoleico. Existiu, também, um aumento significativo do EPA e do DHA e uma diminuição do rácio n-6/n-3 (Mordenti et al., 2010). Em suínos a utilização desta microalga foi estudada por Sardi et al. (2006) com

uma inclusão de 0,25% e 0,50% durante 4 semanas e 0,25% em 8 semanas tendo como resultado uma diferença significativa no conteúdo de ácido linolénico, que foi mais baixo no grupo suplementado durante as 8 semanas, no conteúdo de DHA, que foi superior em todos os grupos em comparação com o do controlo mas especialmente no grupo suplementado com 0,50% de microalga e o rácio n-6/n-3 foi ligeiramente mais baixo, ainda sendo significativo, nos grupos suplementados do que o do controlo. Neste estudo não houve diferenças significativas na cor, no pH e na composição química da carne. Abril et al. (2003) não observaram quaisquer diferenças de mortalidade e peso corporal e dos órgãos entre suínos suplementados com esta microalga, com uma incorporação de 1,10% a 5,51% do dia 79 a 106 e 0,39% a 1,94% do dia 107 ao dia 120 nas dietas de acabamento, e o grupo de controlo, no entanto houve diferenças no ganho de peso diário e no índice de conversão entre os diversos grupos estudados sendo que a inclusão da microalga teve um impacto positivo nestes parâmetros. No estudo efetuado por Yan e Kim (2013) em frangos de engorda verificou-se que a incorporação de 0,1% e 0,2% de *Schizochytrium* durante 35 dias não afetava significativamente o aumento de peso, a ingestão de alimento e o índice de conversão, no entanto houve um aumento do ácido oleico, do total de ácidos gordos n-3 e de DHA e a diminuição dos SFA e do rácio n-6/n-3.

3 A carne de coelho

3.1 Qualidade da carne de coelho

Qualidade da carne é um termo amplo que envolve características químicas, físicas e sensoriais, sendo que estas podem ser afetadas por diversos fatores. A sua definição depende para quem nos estamos a dirigir, se ao produtor, ao distribuidor ou ao consumidor (Dalle Zotte, 2002; Tumová et al., 2014).

A definição de qualidade, por parte do consumidor, está condicionada por mudanças na sociedade e não só inclui as propriedades nutricionais, características sensoriais, salubridade, fatores tecnológicos como também inclui a sua perceção ou visão das condições de bem-estar animal, o impacto da produção animal no meio ambiente e segurança alimentar (Dalle Zotte, 2002).

A carne de coelho é uma carne que vai ao encontro com as exigências dos consumidores atuais no que toca às suas características nutricionais. É uma carne magra, com um conteúdo lipídico altamente insaturado (60% dos ácidos gordos totais), é rica em proteína (20-21%) de alto valor biológico, tem um valor de colesterol e sódio baixos sendo rica em potássio, fósforo e magnésio (Dalle Zotte, 2002 a citar Bielanski 200 e Parigi 1992; Petracci et al., 2009).

Com estas características seria de esperar que o consumo de carne de coelho tivesse vindo a aumentar o que, no caso da Europa, não se verifica como pode ser visto através da Figura 4 que mostra a evolução da produção da carne de coelho de 2006 a 2016 (FAOSTAT, 01/12/2018).

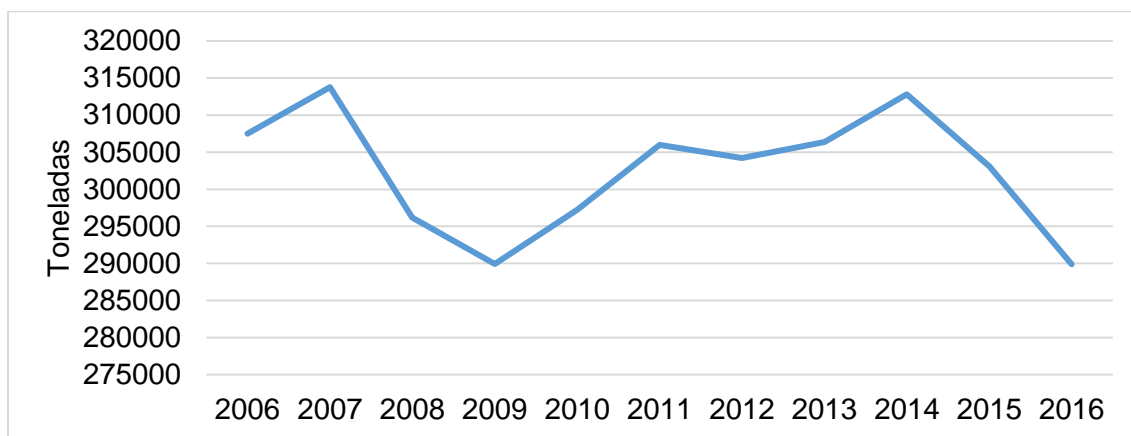


Figura 4 Evolução da produção da carne de coelho na Europa (em toneladas) (adaptado de FAOSTAT, 01/12/2018)

A carne de coelho é consumida principalmente na região mediterrânea, em países como a França, Itália, Malta, Portugal e Espanha, e noutros países europeus, como a Bélgica, República Checa, Alemanha e Luxemburgo. É considerado um mercado de especialidade visto que o seu consumo, comparado com o das outras carnes, é menos de 3% na União Europeia (European Commision, 2015; Cullere e Dalle Zotte, 2018).

A constante regressão do consumo de carne de coelho pode estar ligada a dois fatores: preço e apresentação do produto. Os custos de produção de carne de coelhos são o dobro dos da carne de frango e cerca de 20 a 30% mais altos que os custos de produção de porco, o que se irá refletir no preço apresentado ao consumidor. Quanto à apresentação o consumidor atual não se sente atraído pela carcaça inteira/metades, dando preferência a alimentos fáceis e rápidos de preparar e/ou cozinhar, pelo que é necessário que haja uma diversificação do produto neste sentido (Dalle Zotte, 2002).

3.2 Composição química da carne

A composição química da carne de coelho apresenta-se no Quadro 4, sendo também esta composição comparada com a carne de frango e peru.

Quadro 4 Composição química da carne de coelho, frango e peru, por cada 100g de carne fresca (adaptado de Cavani et al., 2009)

	Coelho		Frango		Peru	
	Lombo	Perna	Peito ¹	Perna ¹	Peito ¹	Perna ¹
Água (g)	75,0	73,5	74,8	76,1	74,2	76,2
Proteína (g)	22,4	21,3	23,1	20,1	24,6	20,5
Gordura (g)	1,4	3,7	1,2	3,8	0,7	2,7
Energia (kcal)	102	119	104	115	104	106
Colesterol (mg)	48	60	62	80	62	81

¹Sem pele.

3.2.1 Proteína da carne

O valor biológico das proteínas é definido por Dalle Zotte (2004) como a proporção entre o azoto absorvido e o azoto depositado, sendo que quanto maior o valor biológico, maior vai ser a quantidade de proteína assimilada e maior será a capacidade de sintetizar tecido muscular. Os alimentos ingeridos pelo Homem devem conter os 9 aminoácidos essenciais que o organismo não consegue sintetizar, mas também cobrir as necessidades para crescimento e/ou renovação das proteínas corporais. A proteína da carne de coelho é relativamente constante (Combes e Dalle Zotte, 2005).

A composição de aminoácidos essenciais presentes na carne de coelho apresenta-se descrita no Quadro 5.

Quadro 5 Aminoácidos essenciais da carne de coelho, expresso em g/100g de carne fresca. (Adaptado de Combes, 2004)

Aminoácido	Média (g/100 g)	cv (%)
Lisina	1,84	1
Metionina	0,54	-
Metionina + Cistina	1,10	-
Histidina	0,52	3
Treonina	1,11	6
Valina	0,98	1
Isoleucina	0,91	12
Leucina	1,80	0,24
Arginina	1,12	13
Tirosina	0,66	15
Fenilalanina	0,84	30
Triptofano	0,10	-

A existência de um equilíbrio favorável de aminoácidos essenciais e uma utilização digestiva e biodisponibilidade dos aminoácidos muito elevadas confere à proteína da carne um alto valor biológico (Combes e Dalle Zotte, 2005).

Segundo Martin (2001) o perfil dos aminoácidos da carne de coelho é muito semelhante ao das necessidades humanas.

3.2.2 Minerais da carne

O Quadro 6, faz uma comparação relativamente aos conteúdos minerais entre a carne de coelho, de porco, de vaca, vitela e de frango.

Quadro 6 Conteúdo mineral da carne de coelho, porco, vaca, vitela e frango, expressa em mg/100g de carne fresca (adaptado de Dalle Zotte e Szendrő, 2011)

	Coelho	Porco	Vaca	Vitela	Frango
Cálcio	2,7-9,3	7-8	10-11	9-14	11-19
Fósforo	222-234	158-223	168-175	170-214	180-200
Potássio	428-431	300-370	330-360	260-360	260-330
Sódio	37-47	59-76	51-89	83-89	60-89
Ferro	1,1-1,3	1,4-1,7	1,8-2,3	0,8-2,3	0,6-2,0
Selénio (µg)	9,3-15	8,7	17	<10	14,8

Quando comparadas as constituições minerais das diversas carnes podemos facilmente observar que a carne de coelho é aquela que contém um menor teor de cálcio e de sódio, o que torna particularmente aconselhável o consumo desta carne para pessoas hipertensas (Dalle Zotte e Szendrő, 2011).

A carne de coelho é rica em fósforo e o consumo de 100 g de carne de coelho cobre cerca de 37% das necessidades diárias de um homem adulto (Combes, 2004).

Como as outras carnes brancas, a carne de coelho tem um baixo teor de ferro, mas pode contribuir para cobrir as necessidades diárias em ferro (Dalle Zotte e Szendrő, 2011).

A quantidade média de potássio por cada 100 g de carne é de 429 mg para a carne de coelho enquanto para a carne de porco é de 335 mg, a carne de vaca é de 345 mg, a carne de vitela é de 310mg e a carne de frango contém cerca de 295 mg (Dalle Zotte e Szendrő, 2011).

3.2.3 *Lípidos da carne*

A fração lipídica é dividida em lípidos estruturais, sendo estes os fosfolípidos e o colesterol, e os lípidos de reserva, os triacilgliceróis (Dalle Zotte, 2004). Sendo esta fração lipídica fortemente variável nos coelhos. Os depósitos de gordura nos coelhos são de dois tipos: depósitos de adiposos dissecáveis, correspondente aos depósitos peri-reais, subcutâneos, mesentéricos e intermusculares e os não dissecáveis que correspondem aos depósitos intramusculares. O valor da fração lipídica vai variar consoante a amostra analisada e o tipo de manejo (Combes, 2004).

Quando não é tida em conta a origem da amostra, a média de lípidos presentes na carne é de cerca de 5 g/ 100 g de carne. É uma carne com um teor de lípidos comparável à carne de vitela (de 1 a 7 g/ 100 g de carne) e de frango (de 0,9 a 12 g/ 100 g de carne) e tem um teor de lípidos inferior ao teor médio de lípidos da carne de porco (3 a 22 g/ 100 g de carne) (Dalle Zotte, 2004).

Geralmente os lípidos presentes na carne contém menos de 50% de ácidos gordos saturados e até 65% de ácidos gordos insaturados (monoinsaturados e polinsaturados) (Dalle Zotte e Szendrő, 2011).

No Quadro 7 pode observar-se as proporções relativas da composição dos ácidos gordos, o rácio entre os ácidos gordos insaturados n-6 e n-3 e o teor de colesterol presentes na carne de porco, vaca vitela, frango e coelho.

Quadro 7 Proporções relativas de diferentes tipos de ácidos gordos (em % do total de AG) e teor de colesterol (em mg/100g) dos lípidos intramusculares no longissimus dorsi (no peito em frango) (N- número de referências) (Adaptado de Dalle Zotte e Szendrő, 2011)

	Porco	Vaca	Vitela	Frango	Coelho
	Média ± DP (N)	Média ± DP (N)	Média ± DP (N)	Média ± DP (N)	Média ± DP (N)
AGS	38,1 ± 2,5 (9)	45,2 ± 3,8 (14)	45,7 ± 5,4 (10)	32,7 ± 4,9 (9)	38,9 ± 4,4 (21)
MUFA	46,7 ± 6,1 (9)	43,5 ± 5,4 (14)	39,8 ± 5,5 (10)	35,4 ± 9,9 (9)	28,0 ± 4,1 (21)
20:5 n-3 (EPA)	0,14 ± 0,15 (8)	0,25 ± 0,23 (13)	0,41 ± 0,40 (8)	0,13 ± 0,06 (4)	0,15 ± 0,12 (14)
22:6 n-3 (DHA)	0,15 ± 0,17 (8)	0,07 ± 0,08 (11)	0,16 ± 0,16 (8)	1,01 ± 0,93 (5)	0,31 ± 0,31 (4)
PUFA	13,8 ± 6,9 (8)	8,79 ± 3,83 (14)	13,3 ± 7,8 (10)	27,4 ± 7,3 (19)	32,5 ± 6,1 (21)
n-6	14,3 ± 6,2 (6)	7,55 ± 3,61 (10)	9,07 ± 6,10 (6)	26,2 ± 7,0 (6)	24,1 ± 5,6 (12)
n-3	0,72 ± 0,23 (6)	1,43 ± 0,92 (9)	2,14 ± 0,97 (5)	1,99 ± 1,05 (6)	5,50 ± 4,66 (13)
n-6/n-3	21,9 ± 16,6 (7)	8,90 ± 7,30 (13)	6,61 ± 6,09 (10)	15,8 ± 5,4 (6)	7,02 ± 3,62 (14)
Colesterol	62,7 ± 22,4 (6)	48,7 ± 8,1 (7)	52,3 ± 5,8 (4)	55,3 ± 4,6 (5)	47,0 ± 7,9 (5)

Como se pode visualizar, a carne de coelho não difere grandemente das outras carnes mais consumidas quando se fala nos ácidos gordos saturados sendo que a grande diferença está essencialmente na quantidade de ácidos gordos polinsaturados. Quando comparados os ácidos gordos polinsaturados podemos observar que em média a carne de coelho tem cerca de 32,5% em % dos ácidos gordos totais enquanto a carne de suíno tem cerca de 13,8%, a de vaca cerca de 8,79%, a de vitela tem cerca de 13,3% e a de frango tem cerca de 27,4%. Quanto ao valor de ácidos gordos n-3 também é superior na carne de coelho quando comparado ao das outras carnes. É recomendável que o rácio de n-6/ n-3 seja 5 e, tendo isto em mente, a carne de coelho é das que mais se aproxima deste ideal (Martin,2001).

Segundo Dalle Zotte e Szendrő, (2011) apesar de um rácio de n-6/n-3 mais baixo ser desejável para a redução de doenças crónicas, mais importante que este rácio é ter em conta a ingestão absoluta de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa n-3.

A composição dos ácidos gordos nos tecidos dos monogástricos pode ser facilmente alterada através da dieta, sendo então possível o aumento dos ácidos gordos polinsaturados através de alimentos adequados (Dalle Zotte e Szendrő, 2011). No entanto, aumentar o conteúdo de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa n-3 pode levar ao aumento do risco de oxidação

da carne visto que este tipo de ácidos gordos são ricos em metais pro-oxidativos e geralmente baixos em antioxidantes endógenos (Dalle Zotte e Szendrő, 2011).

Quanto ao colesterol a carne de coelho tem um teor mais baixo quando comparado com as outras carnes.

No Quadro 8 é possível visualizar-se com um maior pormenor a composição da carne de coelho quanto ao seu perfil de ácidos gordos.

O consumo de ácidos gordos de cadeia longa n-3 tais como o EPA e o DHA na alimentação humana tem estado associado com vários efeitos positivos na saúde nomeadamente em doenças cardiovasculares, depressão e funcionamento cognitivo (Tres et al., 2014). Uma vez que a carne de coelho é uma carne rica neste tipo ácidos gordos polinsaturados torna-se nutricionalmente interessante.

Quadro 8 Perfil de ácidos gordos de carne fresca de coelho, na carcaça e no músculo *Longissimus lumborum*. (CV- coeficiente de variação; n- número de valores retirados da bibliografia) (Adaptado de Combes, 2004)

Ácidos gordos (% de AG totais)	Carcaça			Músculo <i>longissimus lumborum</i>		
	Média	CV (%)	n	Média	CV (%)	n
14:0	2,81	34	45	2,49	40	27
15:0	0,56	24	17	0,57	23	9
16:0	27,86	16	48	26,18	15	30
17:0	0,59	28	19	0,56	35	9
18:0	7,49	19	48	7,32	17	30
20:0	0,26	82	18	0,31	81	10
22:0	0,10	55	10	0,11	42	9
SFA totais %	39	14	45	38,06	12	30
14:1 <i>cis</i> -9	0,36	74	17	0,26	65	8
15:1	0,14	103	8	0,10	-	1
16:1 <i>cis</i> -9	3,75	56	48	2,90	48	30
17:1	0,29	52	14	0,17	88	4
18:1 <i>cis</i> -9	24,22	14	48	23,08	12	30
20:1 <i>cis</i> -9	0,27	74	29	0,29	80	20
MUFA %	27,97	17	40	26,71	12	27
18:2 n-6	23,55	20	57	24,83	15	37
18:3 n-3	2,41	58	60	2,22	63	40
20:2	0,48	105	21	0,63	100	11
20:3 n-6	0,50	122	20	0,72	100	11
20:4 n-6	3,31	59	53	4,11	37	36
20:5 n-3	0,49	112	33	0,57	98	28
21:5	0,49	68	17	0,49	68	17
22:5 n-3	0,77	74	29	0,79	73	28
22:6 n-3	1,11	125	30	1,17	121	28
PUFA (%)	33,75	21	45	36,48	17	34
Total n-3 (%)	5,77	46	26	5,99	46	22
Rácio n-6/n-3	5,86	47	24	5,47	45	20

4 Oxidação da carne

A oxidação é um dos mecanismos mais importantes da degradação não microbiana da carne. Esta reação pode resultar na degradação sensorial da carne e dos produtos cárneos, mais concretamente na degradação da cor, do aroma e sabor e na perda do seu valor nutricional. A oxidação, na carne, pode ser iniciada endogenamente por via de iões metálicos, especialmente pelo ferro heme, e por via exógena promovida por espécies reactivas do oxigénio (como por exemplo $\bullet\text{OH}$). Existem diversos fatores que podem influenciar esta reação tais como a espécie animal, a raça, o tipo de músculo, a dieta (gordura, presença de antioxidantes, etc), a saúde e os processos do pós-abate (Guyon et al., 2016).

Os lípidos encontram-se naturalmente presentes nos alimentos ou são adicionados aos alimentos processados uma vez que tem um papel essencial na nutrição e no sabor destes. No entanto a oxidação lipídica é a principal causa da perda de qualidade nos alimentos pelo que se tornou num desafio para a indústria alimentar (Mariutti e Braganolo, 2017).

4.1 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração da qualidade da carne e dos produtos cárneos, uma vez que quando os lípidos oxidam e interagem com os outros componentes da carne, como os pigmentos e outras proteínas, hidratos de carbono e vitaminas ocorrem mudanças indesejáveis ao nível da cor, sabor, aroma e valor nutritivo (Love e Pearson, 1971; Guyon et al., 2016). Esta degradação pode levar à rejeição dos produtos por parte do consumidor (Silva et al., 1999)

O processo de oxidação lipídica começa imediatamente após o abate e continua durante a maturação, enquanto o músculo é convertido em carne, durante o processamento e armazenamento. Existem diversos fatores que influenciam a intensidade da oxidação lipídica na carne, anteriormente ao abate existe o fator stress e lesões físicas, após abate depende do pH, da temperatura da carcaça, encurtamento pelo frio e técnicas de tenderização (Mariutti e Braganolo, 2017).

A oxidação lipídica pode ocorrer em vários tipos de armazenamento da carne e dos produtos cárneos tais como: em carne crua a temperaturas de refrigeração, carne conservada através de congelação, carne cozinhada e curada, congelada a seco e em produtos cárneos irradiados. Apesar disto a carne crua magra pode manter-se estável durante o período de vários meses até um ano dependendo da espécie animal e das condições de armazenamento (Love e Pearson, 1971). A oxidação ocorre devido à composição complexa destes produtos que consiste em vários tipos de lípidos, quer saturados quer insaturados, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas e pigmentos (Pateiro et al., 2018).

Durante a oxidação lipídica dá-se a formação de hidroperóxidos, produto primário resultante da oxidação dos ácidos gordos e através do qual se pode ver o desenvolvimento da oxidação lipídica, que posteriormente irá originar novas reações de degradação e gerar compostos voláteis indesejáveis tais como aldeídos, cetonas, ácidos e álcoois. Além de se observar o desenvolvimento da oxidação lipídica através dos hidroperóxidos pode ser também observada através dos produtos secundários como pentanal, hexanal e malonaldeído (MDA) (Mariutti e Braganolo, 2017; Pateiro et al., 2018).

A oxidação lipídica (Figura 5) é o resultado de reações em cadeia que ocorrem em três fases em simultâneo (iniciação, propagação e terminação). Durante a fase de iniciação os ácidos gordos insaturados reagem com uma molécula de oxigénio, esta reação irá dar origem a um radical livre. Durante a fase de propagação os radicais livres irão reagir com o oxigénio dando então origem a hidroperóxidos, considerados os principais produtos primários da oxidação lipídica, e radicais livres. Posteriormente estes compostos dão origem a compostos carboxílicos, cetonas, álcoois e aldeídos, sendo estes produtos secundários da oxidação lipídica (Gray, 1978; Guyon et al., 2016)

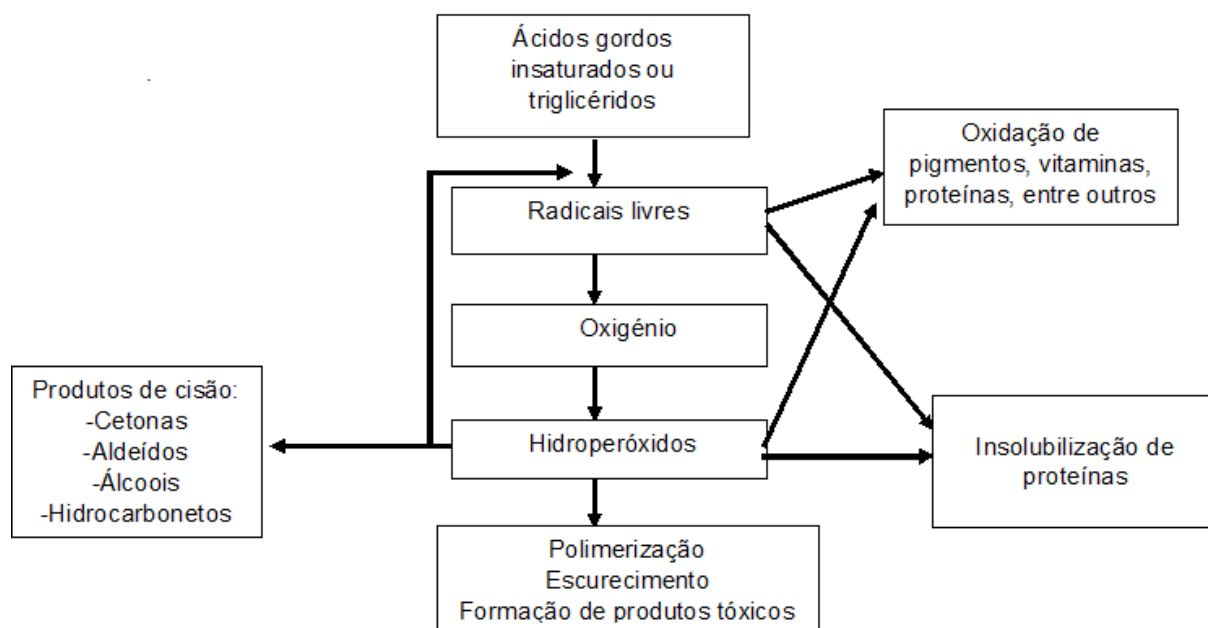


Figura 5 Esquema geral da oxidação lipídica (retirado de Silva et al., 1999).

A oxidação dos ácidos gordos insaturados é um processo que ocorre na presença de oxigénio, podendo ocorrer de forma enzimática ou não-enzimática e é induzida ou catalisada pela luz, calor, fotossensibilizadores, metais e espécies reativas a oxigénio e azoto. A oxidação não-enzimática pode ocorrer através de dois mecanismos a autooxidação e a fotooxidação, sendo ambos dependentes da presença do oxigénio para que possam ocorrer. Por sua vez a oxidação enzimática depende da ação da lipoxigenase (Mariutti e Braganolo, 2017).

Para a medição da oxidação da carne o método mais usado é através da medição do índice de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Betifoulie et al., 2002). Durante a utilização deste método existe reação do ácido tiobarbitúrico com o malonaldeído, que é um produto secundário da reação de oxidação lipídica, formando-se um complexo rosado que é depois medido através de absorvância em espectrofotómetro. É possível observar quanto maior a oxidação da carne maior vai ser a presença de MDA na carne.

Quando existe uma carne rica em PUFA's a sua estabilidade oxidativa pode estar comprometida, isto é o caso do coelho que uma vez que é uma carne rica em PUFA's pode oxidar mais rapidamente que outras carnes pelo que é necessário encontrar uma solução de modo a contrariar este efeito como a utilização de antioxidantes (Xiccato, 1999; Hernández e Dalle Zotte, 2010).

Quando comparada com as carnes de bovino, de frango, de novilho e de suíno, a carne de coelho é a que apresenta uma maior quantidade de mg MDA/ kg carne, sendo por isso a carne mais suscetível a oxidação. No entanto é possível tomar medidas para que a oxidação seja limitada, e após 7 dias e com um armazenamento em bom estado com uma refrigeração de 4°C o valor de TBARS pode permanecer baixo ficando entre os 0,048 mg MDA/ kg de carne a 0,101 mg MDA/ kg carne (Combes e Dalle Zotte, 2005).

Capítulo III - Materiais e métodos

O trabalho experimental presente decorreu nas instalações do sector experimental de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia. As análises laboratoriais foram efetuadas no laboratório Professor Pais de Azevedo, no Instituto Superior de Agronomia, e no laboratório de Sistemas de Produção Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária.

1. Delineamento experimental

1.1 Animais

No decorrer deste trabalho experimental foram utilizados 40 coelhos recém-desmamados com um peso médio inicial de 974 g. Os animais foram divididos em quatro grupos de 10 coelhos cada com um peso homogéneos, sendo alojados individualmente em gaiolas metabólicas e recebendo alimento e água *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente e o alimento distribuído e refugado foi pesado três vezes por semana, com exceção da terceira semana em que foi pesado diariamente. Deste modo foi possível calcular a ingestão diária de alimento, o ganho médio diário e o índice de conversão alimentar.

No final do ensaio os coelhos foram atordoados através de choque elétrico e abatidos e foi feita a recolha das amostras necessárias. Foi realizada a pesagem dos animais antes do abate e da carcaça, bem como a pesagem dos órgãos internos, incluindo aparelho digestivo (cheio e vazio), fígado, gordura escapular e perirenal, estômago (cheio e vazio) e ceco (cheio e vazio).

1.2 Regimes alimentares

Foram formulados dois regimes alimentares experimentais para que fosse estudado o efeito da inclusão da microalga *Nannochloropsis oceanica* na alimentação de acordo com o tempo. Foi formulado um regime de controlo (SA), em que não foi incluída a *Nannochloropsis oceanica* e um regime com 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* que foi distribuído por três grupos de animais (AA, A2 e A1) em períodos diferentes. A utilização de 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* teve como objectivo substituir de igual forma a quantidade de gordura fornecida pelos 3% de soja integral utilizada no regime controlo. Ao grupo AA foi fornecido o regime com *Nannochloropsis oceanica* durante as 5 semanas de ensaio, ao grupo A2 foi fornecido o regime nas duas semanas anteriores ao abate e ao grupo A1 foi fornecido o regime na última semana anterior ao abate.

Os regimes foram formulados de modo a que fossem semelhantes sendo a diferença apenas na substituição da soja integral pela *Nannochloropsis oceanica*, de modo que as dietas fossem isoproteicas e isoenergéticas. A composição centesimal, a composição química dos regimes alimentares formulados e a sua composição em ácidos gordos está apresentada nos Quadros 9, 10 e 11, respetivamente.

Quadro 9 Composição centesimal (em %) dos regimes alimentares

	Regime de controlo	Regime com <i>Nannochloropsis oceanica</i>
Milho	20,0	20,0
Sêmea de trigo	10,0	10,0
Bagaço de soja	16,0	15,0
Bagaço de girassol	7,5	7,5
Luzerna	25,0	25,0
Palha de gramíneas	12,0	12,0
Polpa de beterraba	5,0	4,74
Soja integral	3,0	0,0
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	0,0	4,45
Premix¹	0,2	0,2
Cloreto de sódio	0,5	0,5
Fosfato de bicálcico	0,5	0,5
Carbonato de cálcio	-	-
DL metionina	0,3	0,05
L-lisina	-	0,05

¹Composição do premix fornecido por kg de dieta: vitamina A, 1000UI; vitamina D3, 1500UI; vitamina E, 15mg; vitamina K3, 1.5mg; vitamina B1, 1mg; vitamina B2, 2mg; vitamina B6, 1.5mg; vitamina B12, 0.01mg; ácido pantoténico, 8mg; ácido nicotínico, 25mg; biotina, 0.02mg; betaína, 136.5mg; robenidina, 50mg; Co, 0.7mg; Cu, 5mg; Fe, 30mg; I, 1mg; Mn, 15mg; Se, 0.2mg; Zn, 30mg; etoxiquina 12.5mg.

Quadro 10 Composição química (% na Matéria seca) dos regimes alimentares

	Regime de controlo	Regime com <i>Nannochloropsis oceanica</i> ¹
Matéria seca	91,5	90,4
Matéria orgânica	91,7	91,3
Proteína Bruta	18,5	18,1
Gordura Bruta	3,5	3,2
NDF¹	39,3	38,8
ADF²	22,0	21,6
ADL³	4,3	4,2
Hemicelulose (NDF-ADL)	17,3	17,2
Celulose (ADF-ADL)	17,7	17,4
Energia kcal/kg Matéria seca	4436	4430

¹Composição da *Nannochloropsis oceanica* fornecida em % da matéria original: 96,9% de Matéria seca; 25,0% de Cinza; 33,6% de Proteína Bruta; 14,0% de Gordura Bruta.

Quadro 11 - Composição em ácidos gordos (em g/100g de ácidos gordos totais) dos regimes alimentares. (n.d. – não detetado).

	Regime Controlo	Regime com <i>Nannochloropsis oceanica</i>
14:0	n.d.	1,0
16:0	16,7	19,6
16:1 <i>cis</i>-9	0,1	3,9
18:0	2,9	2,3
18:1 <i>cis</i>-9	19,9	17,2
18:1 <i>cis</i>-11	1,1	0,9
18:2 n-6	53,0	45,2
20:0	0,5	0,4
18:3 n-3	5,9	4,6
20:4 n-6	n.d.	0,8
20:5 n-3	n.d.	4,1

1.3 Colheitas

Foi feita a recolha das fezes na terceira semana de ensaio, durante quatro dias consecutivos em tabuleiro de recolha de fezes das gaiolas. As fezes recolhidas foram congeladas a -20°C para serem analisadas posteriormente.

Durante o abate foram recolhidos os conteúdos estomacal e cecal para medição do pH, os membros posteriores e o músculo *longissimus dorsi* foram recolhidos e separados.

2. Análises químicas

2.1 Preparação de amostras

Para que fosse possível realizar análises às amostras estas tiveram de ser sujeitas a uma preparação prévia. Os regimes analisados foram previamente moídos num moinho Retsch SK 100 (Retsch GmbH, Haan, Alemanha) com um crivo de 1 mm. Quanto às fezes foram descongeladas e secas a uma temperatura de 65°C, durante 72 horas numa estufa de Memmert UF 750 (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Alemanha) e foram moídas num moinho de Retsch com crivo de 1 mm.

Por sua vez, a carne do *Longissimus dorsi* foi congelada a -20°C, a carne da perna direita do coelho foi conservada a -20°C e posteriormente liofilizada e moída num moinho de Retsch com um crivo de 1mm, por fim a perna da perna esquerda do coelho foi moída e conservada a -80°C.

2.2 Determinação da matéria seca e da cinza

Para a determinação da matéria seca e da cinza dos alimentos, fezes e carne seguiu-se o método proposto por EGRAN (2001).

Foram pesadas cerca de 3 g de amostra e colocadas na estufa Memmert UN55 (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Alemanha) a 103° C até peso constante. Posteriormente as amostras foram colocadas na mufla (Heraeus MR 260 E, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemanha) a 550°C para determinar a cinza. E qualquer uma destas determinações as amostras ficaram nos respetivos equipamentos durante a noite, sendo posteriormente colocadas num exsiccador para que pudessem arrefecer até temperatura ambiente, sem ganho de humidade, até se dar a pesagem.

2.3 Determinação da proteína bruta

Para a determinação da proteína bruta (PB) dos alimentos, fezes e carne foi utilizado o método de Kjeldahl.

A determinação da PB é composta por três fases: digestão, destilação e titulação. Na fase da digestão foi colocada 1g de amostra (exceto para a carne onde foi colocada cerca de 0,25 g de amostra), 2 pastilhas de Kjeldahl e 15 ml de ácido sulfúrico puro num tubo de kjeldahl, este foi seguidamente colocado no digestor (Foss tecator 2020 Digestor, FOSS Analytical

A/S,Hilleroed, Dinamarca) a 400 °C durante cerca de sessenta minutos, depois das amostras arrefecerem juntou-se 30 ml de água destilada.

Posteriormente, na fase da destilação, o tubo de kjeldahl foi colocado no destilador (Selecta Pro-nitro S (JP Selecta SA, Barcelona, Espanha), onde este juntou água destilada e 50 ml de solução de NaOH a 50%. O destilado foi, posteriormente, recolhido em ácido bórico a 1% com indicador e foi realizada a titulação com uma solução de HCl.

2.4 Determinação da gordura bruta

A determinação da gordura bruta na carne nos alimentos e fezes foi feita por hidrólise e extração.

Para a realização da hidrólise foram pesadas 3 gramas de amostra para um tubo de ensaio, adicionou-se celite e 100 ml de HCl 3M e deixou-se em ebulição durante uma hora. Foi feita a filtração automática e os cadinhos filtrantes foram posteriormente colocados a 60°C durante a noite.

Para a realização da extração da gordura das amostras foi utilizado um sistema de Soxtec, onde foram colocadas na unidade de extração de gordura a 110 °C, copos de alumínio com 40 ml de éter de petróleo, sendo que os copos de alumínio foram pesados previamente. Os cadinhos que continham as amostras foram colocados nos copos de alumínio onde ficaram, durante 30 minutos, submergidos no éter. Seguidamente, os cadinhos ficaram, durante uma hora, emersos sob os copos de alumínio, sendo feita posteriormente a evaporação. Os copos de alumínio foram retirados e colocados na estufa Memmert TV30 (Mettler GmbH + Co.KG, Schwabach, Alemanha) a 60°C durante a noite, sendo feito depois o arrefecimento no exsiccador e a pesagem do resultante.

2.5 Determinação dos componentes fibrosos

O método utilizado para a realização da determinação dos componentes fibrosos foi o método de Van Soeste et al. (1991). Foram determinados os três diferentes resíduos correspondentes ao NDF, o ADF e o ADL, num processo sucessivo através da hidrólise sucessiva de uma mesma amostra. Para tal foi utilizado um reagente detergente neutro, para determinar o NDF, seguido de um detergente ácido, de modo a determinar o ADF, e, finalmente, foi feita uma hidrólise ácida seguida de filtração para determinação do ADL.

Foi colocada 1 g de amostra nos cadinhos com 100 ml de solução detergente neutra, de modo a ser realizada uma extração a quente, esta permaneceu em ebulição lenta durante cerca de uma hora. Seguidamente foi feita a filtração com água destilada. A amostra foi posteriormente colocada numa unidade de extração a frio para que fosse realizada uma lavagem com

acetona. O cadinho foi, então, colocado na estufa (Mettler UN55, Mettler GmbH + Co.KG, Schwabach, Alemanha) a 103°C durante a noite, seguidamente arrefeceu-se a amostra num exsiccador e realizou-se a pesagem, de modo a obter o valor de NDF.

Seguidamente repetiu-se o processo anterior, na mesma amostra, mas foi utilizado uma solução detergente ácida, deste modo foi obtido, assim, o ADF.

Finalmente, à amostra juntou-se ácido sulfúrico (a 72%) a cada hora durante três horas, sendo depois feita a filtração com água destilada quente. O cadinho foi colocado na estufa a 103°C, permanecendo aí durante a noite, a amostra arrefeceu num exsiccador, onde foi posteriormente pesada e colocada na mufla a 550°C durante o período da noite. Por fim, procedeu-se ao último arrefecimento e pesagem do processo, obtendo-se assim o ADL.

2.6 Determinação do pH

O pH foi medido no dia do abate, sendo feito aos conteúdos estomacais e cecais, com um potenciómetro Metrohm 744 pH Meter (Metrohm AG, Herisau, Suíça).

2.7 Cor da carne

Para realizar a determinação da cor da carne foi utilizado um sistema de coordenadas CIElab (1976). A cor foi medida no músculo *Longissimus dorsi* de cada coelho, através de um colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta, Japão). A medição da cor realizou-se dois dias após o abate, tendo a carne sido conservada a -20°C.

Foi realizado três disparos de cada amostra tanto do lado esquerdo do músculo como do lado direito.

2.8 Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA)

O método para a determinação do TBA foi adaptado da Norma Portuguesa (NP) 3356 de 2009.

Através do índice de TBA foi quantificada a oxidação lipídica, expressa em miligramas de aldeído malónico por 100 g de amostra pelo método espectrofotométrico.

Foram pesados 15 g de carne da perna, que tinha sido anteriormente armazenada a -80°C, homogeneizou-se com 30 ml de solução de ácido tricloroacético e extraiu-se durante 1 minuto. Foi filtrada por papel de filtro nº 1 para um balão cónico, para que fosse obtida uma solução límpida.

Seguidamente, foi colocado 5 ml de extracto e 5 ml de solução TBA num banho de água fervente durante 40 minutos, deixando-se depois a arrefecer à temperatura ambiente.

O conteúdo de cada tubo foi, então, transferido para células do espectrofotômetro (Hitachi U-2001, Triad Scientific, Manasquan, Estados Unidos), a partir daqui registou-se a leitura de absorvância a um comprimento de onda de 560 nm contra ensaio em branco.

Uma vez que a carne foi conservada a uma temperatura de -80°C esta determinação correspondeu ao dia do abate e ao sétimo dia após o abate com um armazenamento a -20°C.

2.9 Perda de água por cozedura

Para determinar a perda de água da carne por cozedura amostras de *Longissimus dorsi* foram cortadas, em cubos de 2,5 cm de lado, e pesadas. Foram colocadas em sacos de plástico em banho-maria a 80°C durante 60 minutos. Posteriormente as amostras foram novamente pesadas e a perda de água determinada.

2.10 Determinação dos ácidos gordos da carne

Para que fosse feita a determinação dos ácidos gordos da carne foi utilizado um método de transesterificação direta de acordo com Alves et al. (2015)

Foi pesado cerca de 0,250 g de amostra de carne liofilizada para tubos (16x 160 mm) com rolhas de teflon, seguidamente colocou-se 1ml de tolueno seco e 1 ml de padrão interno (1mg/ml) e foi colocada num equipamento de ultrassons (Elmasonic S 60H, Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Alemanha) durante 10 minutos.

Foi, depois, adicionado 3 ml de solução metóxido de sódio em metanol 0,5 M e levou-se a um vortex Heidolph (Heidolph Reax top, Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Alemanha) durante 10 segundos.

Seguidamente colocou-se as amostras num banho de água a 50°C durante 30 minutos e com agitação de 40 rpm, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e seguidamente adicionou-se 2 ml de solução ácido clorídrico (HCL)/ metanol e voltou a agitar-se no vortex durante 10 segundos.

De seguida, foram colocadas as amostras num banho de água a 80°C durante 20 minutos e sob agitação de 40 rpm.

Depois de as amostras terem arrefecido a temperatura ambiente foi adicionado 2 ml da solução a 6% de carbonato de potássio (K_2CO_3) e 2 ml de n-hexano, agitou-se no vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 minutos.

Foi colocado cerca de 0,5 g de sulfato de sódio anidro num novo tubo (16 x 160 mm) para onde foi transferida a fase orgânica superior da amostra. Ao resíduo que restou de ter sido retirada a fase orgânica superior foi novamente adicionado 2 ml de n-hexano e tornou-se a agitar em vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 minutos.

Foi novamente recolhida a fase orgânica superior para o tubo que continha sódio anidro. Agitou-se este tubo em vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 minutos.

Foi retirada a fase de hexano que continha os ésteres metílicos para um novo tubo (16x100 mm) e evaporou-se o solvente e corrente de azoto a 37°C num equipamento Liebig (Liebig GmbH & Co, Bielefeld, Alemanha).

Por fim, ressuspendeu-se o resíduo em 1 ml de n-hexano, agitou-se e transferiu-se para um vial de GC, que foi conservado numa arca congeladora até posterior análise por cromatografia gasosa.

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detecção por cromatografia gasosa utilizando-se um equipamento Shimadzu 2010Plus (Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida (SP-2560, 100 m × 0,25 mm × 0,20 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Durante a análise o injetor e o detetor foram mantidos a 220°C e 250°C, respetivamente. Utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 1 ml/min e foi injetada 1 µl de amostra. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 50°C (mantida durante 1 min), aumentou depois a 50°C/min até aos 150°C (mantida durante 20 min), aumentou a 1°C/min até aos 190°C (mantida durante 1 min) e finalmente aumentou a 2°C/min até aos 220°C onde foi mantida durante 30 minutos. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação com padrões comerciais (FAME mix 37 components, Supelco Inc., Bellefont, PA, USA). Adicionalmente, as identificações dos ácidos gordos foram confirmadas por espectrometria de massa utilizando-se um equipamento Shimadzu GC–MS QP2010 Plus (Shimadzu, Quioto, Japão). As condições do GC foram semelhantes às utilizadas no GC-FID e as condições do MS foram: temperatura da fonte de ionização, 200°C; temperatura da interface, 220°C; energia de ionização, 70 eV; scan. Os ácidos gordos foram expressos em percentagem do total de ácidos gordos identificados (g/100 g total dos picos identificados).

2.11 Determinação dos ácidos gordos dos regimes alimentares

Para a determinação dos ácidos gordos dos regimes alimentares fornecidos bem como da soja integral e da *Nannochloropsis oceanica* foi usado um método de transesterificação direta de alimentos adaptado de Palmquist e Jenkins (2003).

Foi pesado cerca de 0,200 g de amostra de regimes e de soja integral e 0,100 g de amostra de *Nannochloropsis oceanica* para tubos (16x160 mm) com rolhas de teflon, seguidamente colocou-se 1ml de padrão interno C19:0 (0,5 mg/ ml), 1 ml de tolueno e 3 ml de solução HCL em metanol 1,25M.

Depois de agitar no vortex a baixa velocidade durante 1 minuto as amostras foram colocadas em banho de água durante 2 horas a 70°C, sendo que, seguidamente, se deixou arrefecer à temperatura ambiente.

Adicionou-se 2 ml de solução aquosa 6 % de K_2CO_3 e 2 ml de hexano agitou-se em vortex durante 30 segundos a velocidade média e centrifugou-se durante 5 minutos.

De seguida transferiu-se a fase orgânica para um novo tubo (16 x 160 mm), ao qual foi adicionado previamente cerca de 0,5g de sulfato de anidro (Na_2SO_4), nesta fase as amostras que continham a *Nannochloropsis oceanica* necessitaram de um passo extra em que se colocou 1g de carvão ativado, agitou-se em vortex durante 10 segundos e deixou-se repousar durante a noite, visto que eram amostras muito pigmentadas.

Posteriormente, todas as amostras foram agitadas em vortex durante 10 segundos, centrifugou-se durante 5 minutos e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo.

Foi, então, evaporado o solvente em corrente de azoto a 37°C, adicionou-se 1 ml de n-hexano para GC e colocou-se num vial de GC, que foi conservado numa arca congeladora.

Posteriormente as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa como descrito no ponto 2.10.

2.12 Determinação dos ácidos gordos das fezes

Para a determinação dos ácidos gordos das fezes dos coelhos foi utilizada um método de transesterificação direta combinada de conteúdo ruminal, abomaso ou bactérias, adaptado de T.C Jenkins (2010).

Foi pesado cerca de 0,250 g de amostra de fezes moídas para tubos (16x 160 mm) com rolhas de teflon, seguidamente colocou-se 1ml de tolueno seco e 1 ml de padrão interno (1mg/ml) e foi colocada num equipamento de ultrassons Elmasonic S 60H durante 10 minutos.

Foi, depois, adicionado 2 ml de solução metóxido de sódio em metanol 0,5 M e levou-se a um vortex Heidolph durante 10 segundos.

Seguidamente colocou-se as amostras num banho de água a 50°C durante 15 minutos, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e seguidamente adicionou-se 3 ml de solução HCL/ metanol 1,25M e voltou a agitar-se no vortex durante 10 segundos.

De seguida, foram colocadas as amostras num banho de água a 80°C durante 20 minutos.

Depois de as amostras terem arrefecido a temperatura ambiente foi adicionado 2 ml da solução a 6% de K_2CO_3 e 2 ml de n-hexano, agitou-se no vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 minutos.

Foi colocado cerca de 0,5 g de sulfato de sódio anidro num novo tubo (16 x 160 mm) para onde foi transferida o sobrenadante da amostra. Ao resíduo que restou de ter sido retirada o sobrenadante foi novamente adicionado 2 ml de n-hexano e tornou-se a agitar em vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 minutos.

Adicionou-se cerca de 0,5 g de carvão ativado para as amostras das fezes dos coelhos que foram alimentados com *Nannochloropsis oceanica* e, nestas amostras, deixou-se repousar.

Agitou-se o tubo com o sulfato de anidro em vortex durante 10 segundos e centrifugou-se durante 5 minutos, foi retirada a fase de hexano que continha os ésteres metílicos para um novo tubo (16x100 mm) que foi a evaporar em corrente de azoto a 37°C.

Adicionou-se 1 ml de n-hexano para GC e colocou-se num vial de GC, que foi conservado numa arca congeladora.

Posteriormente as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa como descrito no ponto 2.10.

3. Análise estatística

Os resultados foram comparados por análise de variância a um factor utilizando-se o procedimento MIXED do programa *SAS System for Linear Models* (SAS, 2013). Sempre que o valor de F da análise de variância foi significativo ($p < 0,05$) as médias foram comparadas pelo teste da mais pequena diferença significativa.

Capítulo IV - Resultados e discussão

1. Resultados zootécnicos

Os resultados zootécnicos obtidos durante o ensaio experimental apresentam-se no Quadro 12. A taxa de mortalidade deste ensaio foi de 0%. Na apresentação destes resultados considerou-se um primeiro período de duas semanas correspondente ao período pós-desmame e um período global, correspondente às 5 semanas de ensaio.

Aos 35 dias de idade os animais apresentaram no geral 974 g de peso vivo não havendo diferenças significativas entre animais de diferentes grupos, aos 71 dias de idade o peso vivo final foi em média 2695 g não tendo, também, existido nenhuma diferença significativa entre os animais dos diferentes grupos (para $P < 0,05$).

Quanto ao primeiro período, correspondente ao período dos 35 aos 49 dias de idade, não houve quaisquer diferenças significativas na ingestão diária de alimento, no aumento de peso médio e no índice de conversão. Neste primeiro período no global de todos os animais os valores médios de ingestão diária de alimento, de aumento de peso médio diário e de índice de conversão foram de 132,5 g, 55,0 g e 2,42 g respetivamente.

Tendo em conta o período total do ensaio experimental e quanto à ingestão diária de alimento, o aumento peso médio diário e o índice de conversão não foram verificadas diferenças significativas. Observou-se que a ingestão diária de alimento foi de 160,0 g, o aumento de peso médio diário foi de 49,2 g e o índice de conversão é de 3,26.

De um modo geral estes resultados estão de acordo com os registados por Peiretti e Meineri (2008), com dietas suplementadas com diferentes níveis de outra microalga a *Spirulina platensis* (0%, 5%, 10% e 15%). Estes autores não observaram diferenças significativas nos resultados zootécnicos com a exceção da quantidade de alimento ingerida diariamente nos coelhos suplementados, provavelmente devido a um ajustamento de energia ingerida.

Quadro 12 Efeito da inclusão da *Nannochloropsis oceanica* nos regimes alimentares, com diferentes tempos de suplementação, na ingestão de alimento e no crescimento, desde o desmame até ao abate.

Dieta (n ¹)	SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)	DPR ²	Efeito Estatístico
Peso vivo médio (g)						
Inicial (35 dias)	963,9	966,8	974,4	992,1	79,89	0,860
No fim do 1 ^o período (49 dias)	1759,1	1744,4	1730,0	1743,3	114,30	0,955
Final (71 dias)	2751,1	2725,0	2662,8	2641,2	191,94	0,546
1^o Período (35-49 dias de idade)						
Ingestão diária de alimento (g)	133,9	131,8	131,0	133,2	12,23	0,949
Aumento de peso médio diário (g)	56,8	55,5	54,0	53,7	5,36	0,536
Índice de Conversão	2,37	2,38	2,43	2,49	0,18	0,462
Período total						
Ingestão diária de alimento (g)	166,6	162,1	155,5	155,9	15,60	0,333
Aumento de peso médio diário (g)	51,1	50,2	48,2	47,1	5,13	0,309
Índice de Conversão	3,27	3,24	3,23	3,30	0,17	0,794

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio.

2. Digestibilidade fecal aparente

Os resultados referentes à digestibilidade fecal aparente das diversas frações da dieta estão apresentados no Quadro 13. Estes resultados foram obtidos através da recolha de fezes durante a 3^a semana de ensaio experimental, o que corresponde à 8^a semana de idade dos animais.

Não ocorreu nenhuma diferença significativa ($P < 0,05$) nos coeficientes de utilização digestiva da matéria seca, matéria orgânica e proteína. Quanto ao coeficiente de utilização digestiva da gordura bruta foi significativamente maior no grupo com a dieta de controlo (78,8%) do que no grupo com a dieta suplementada com a *Nannochloropsis oceanica* (75,2%) ($P = 0,001$).

Quando analisados os componentes referentes ao NDF, ADF, ADL, hemicelulose, celulose e energia verificou-se que não existia nenhuma diferença significativa entre os dois grupos em estudo.

Os resultados apresentados são contrários aos registados por Peiretti e Meineri (2008) que registou digestibilidades significativamente mais baixas para os grupos suplementados com a microalga *Spirulina platensis* com uma inclusão de 0%, 5%, 10% e 15%.

Quadro 13 Efeito da presença de *Nannochloropsis oceanica* no coeficiente de utilização digestiva (em %) das várias frações da dieta, obtido a partir da recolha de fezes feita na 8ª semana de idade nos animais do grupo controlo (SA) e grupo alimentado com 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante 5 semanas (AA).

Dieta (n ¹)	SA (10)	AA (10)	DPR ²	Efeito estatístico
Coeficientes de utilização digestiva				
Matéria seca	60,8	61,5	0,02	0,462
Matéria orgânica	61,1	61,8	0,02	0,460
Proteína bruta	76,5	77,0	0,02	0,590
Gordura Bruta	78,8	75,2	0,03	0,001
NDF	28,9	28,5	0,04	0,804
ADF	19,0	17,4	0,04	0,400
ADL	8,1	9,5	0,06	0,573
Hemicelulose (NDF-ADF)	41,5	42,3	0,04	0,655
Celulose (ADF-ADL)	21,6	19,3	0,04	0,221
Energia	61,4	61,5	0,02	0,932

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

3. Digestibilidade aparente dos ácidos gordos

Os resultados referentes à ingestão, excreção e digestibilidade de alguns dos ácidos gordos encontram-se apresentados no Quadro 14.

A quantidade ingerida dos ácidos gordos selecionados foi significativamente ($P < 0,05$) diferente nos dois grupos, como seria de esperar, uma vez que a composição em ácidos gordos dos dois regimes foi diferente. De salientar que os animais alimentados com o regime sem microalga (SA), não ingeriram nem o 20:4 n-6 nem o 20:5 n-3, ao contrário dos alimentados com o regime com a microalga (AA), pois estes ácidos gordos são provenientes exclusivamente da *Nannochloropsis oceanica* adicionada ao regime AA.

Ao analisar os resultados dos ácidos gordos excretados, verificou-se que a excreção do 18:0, 18:1 cis-9 e 18:3 n-3 foi inferior no regime com a microalga comparativamente com o regime controlo. No entanto, ao analisar os resultados da digestibilidade de alguns dos ácidos gordos presentes nos regimes alimentares e nas fezes dos animais que os ingeriram observou-se que os ácidos gordos saturados 16:0, 18:0, o ácido gordo monoinsaturado 18:1 cis-9 e os ácidos gordos polinsaturados 18:2 n-6 e 18:3 n-3 não diferiam significativamente ($P > 0,05$) entre o grupo SA e o grupo AA. No entanto existiram diferenças significativas no 20:0 e no 16:1 cis-9, e apenas são apresentados valores de digestibilidade do 20:4 n-6 e 20:5 n-3 com

a dieta AA porque estes não foram detetados nem no regime SA nem nas fezes dos animais alimentados com este regime.

A digestibilidade do 20:0 foi significativamente maior ($P=0,001$) no grupo com a dieta de controlo (73,5%) do que no grupo AA (66,1%), no entanto, tem de se ter em conta que o 20:0 pode ter origem microbiana, e que no grupo da *Nannochloropsis oceanica* poderá derivar de alguma eventual hidrogenação dos PUFA de cadeia C20, sobretudo do EPA. O 16:1 *cis*-9 teve uma diferença muito significativa ($P<0,001$). Observou-se que a digestibilidade deste ácido gordo foi significativamente maior para o grupo com a dieta com *Nannochloropsis oceanica* (92,1%) quando comparado com a digestibilidade do grupo com a dieta de controlo (63,1%). Esta diferença nas digestibilidades entre os dois grupos poderá estar relacionada com as grandes diferenças nas quantidades ingeridas e do método utilizado para estimar a digestibilidade, pois nos animais alimentados com o regime AA a quantidade ingerida de 16:1 *cis*-9 foi 28x superior à ingerida no regime SA.

Relativamente à digestibilidade do 20:4 n-6 e 20:5 n-3, ela foi bastante elevada, cerca de 80,2% e 89,6%, respetivamente, e não foi determinada no grupo controlo. Os ácidos gordos 20:4 n-6 e 20:5 n-3 são ácidos gordos que estão presentes, no caso das dietas estudadas, exclusivamente na *Nannochloropsis oceanica*, além do mais não se conhece informação de que sejam sintetizados pelas plantas superiores nem pelos microrganismos do sistema digestivo. Assim as elevadas digestibilidades do 20:4 n-6 e 20:5 n-3 sugerem que a *Nannochloropsis oceanica* contém uma parede celular que permite a disponibilização dos nutrientes para absorção em coelhos, ao contrário de outros estudos que sugerem que a parede celular da *Nannochloropsis oceânica* é particularmente resistente ao ataque microbiano no sistema gástrico dos ruminantes (Alves et al 2018).

Quadro 14 - Efeito da *Nannochloropsis oceanica* na quantidade ingerida, quantidade excretada (em mg/dia) e na digestibilidade (em %) dos ácidos gordos. (n.d. – não detetado)

Dieta (n ¹)	SA (10)	AA (10)	DPR ²	Efeito estatístico
Quantidade ingerida (g)				
16:0	3,35	2,83	0,428	0,014
16:1 <i>cis</i> -9	0,02	0,57	0,060	<0,001
18:0	0,58	0,33	0,064	<0,001
18:1 <i>cis</i> -9	3,99	2,48	0,451	<0,001
18:2 n-6	10,63	6,50	1,194	<0,001
20:0	0,09	0,06	0,011	<0,001
18:3 n-3	1,18	0,66	0,129	<0,001
20:4 n-6	n.d.	0,11	0,012	-
20:5 n-3	n.d.	0,58	0,061	-
Quantidade excretada (g)				
16:0	0,35	0,29	0,027	0,491
16:1 <i>cis</i> -9	0,01	0,05	0,011	0,321
18:0	0,16	0,09	0,013	0,004
18:1 <i>cis</i> -9	0,23	0,14	0,018	0,037
18:2 n-6	0,33	0,21	0,029	0,086
20:0	0,02	0,02	0,001	0,171
18:3 n-3	0,04	0,02	0,003	0,008
20:4 n-6	n.d.	0,02	0,001	-
20:5 n-3	n.d.	0,06	0,003	-
Digestibilidade (%)				
16:0	89,50	89,93	1,489	0,518
16:1 <i>cis</i> -9	63,14	92,05	9,828	<0,001
18:0	73,36	73,48	6,750	0,968
18:1 <i>cis</i> -9	94,25	94,33	0,974	0,848
18:2 n-6	96,94	96,92	0,704	0,938
20:0	73,48	66,12	4,113	0,001
18:3 n-3	96,68	96,41	0,802	0,460
20:4 n-6	-	80,16	2,367	-
20:5 n-3	-	89,55	1,198	-

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas.

4. Parâmetros da carcaça de coelho e do desenvolvimento do trato digestivo

Os resultados relativos à influência da presença da *Nannochloropsis oceanica* nos parâmetros da carcaça de coelho e do sistema digestivo encontram-se apresentados nos Quadros 15 e 16 respetivamente. O peso das carcaças, dos vários órgãos internos e do pH estomacal e cecal foram registados durante o decorrer dos abates.

Nos parâmetros da carcaça de coelho considerou-se o peso vivo, o peso da carcaça quente e a percentagem de carcaça quente (rendimento), o peso da carcaça fria, o peso do fígado, da gordura escapular e da gordura peri renal. Não se verificou diferenças significativas entre

os diferentes grupos para os vários parâmetros. No geral, estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Peiretti e Meineri (2011) em que foi fornecido dietas com diferentes níveis de inclusão de *Spirulina platensis* a coelhos e não foi encontrada nenhuma diferença nos parâmetros da carcaça

Nos parâmetros relativos ao sistema digestivo do coelho foram considerados o peso do sistema digestivo total, o peso do estômago tanto cheio e como vazio, o peso do ceco tanto cheio como vazio e o pH estomacal e cecal. Não foram verificadas diferenças significativas para estes diversos parâmetros.

Quadro 15 Efeito da *Nannochloropsis oceanica* nos parâmetros da carcaça de coelho

Parâmetros	Dieta (n ¹)				DPR ²	Efeito estatístico
	SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)		
PV (g)	2752	2726	2664	2643	192,19	0,550
Carcaça quente (g)	1602	1582	1513	1539	128,04	0,412
Carcaça quente (%)	58,2	58,1	56,8	58,2	1,74	0,207
Carcaça fria (g)	1512	1504	1424	1457	120,47	0,352
Carcaça fria (% da carcaça quente)	94,3	94,7	94,1	94,6	1,66	0,701
Fígado (g)	90,5	91,4	79,9	81,3	21,61	0,520
Fígado (g/kg)	32,7	33,4	29,8	30,4	6,38	0,528
Gordura escapular (g)	9,6	9,7	7,8	7,0	2,99	0,134
Gordura escapular (g/kg)	3,5	3,5	2,9	2,6	1,00	0,133
Gordura perirenal (g)	30,8	30,1	27,3	27,1	7,85	0,637
Gordura perirenal (g/kg)	11,1	1,0	10,1	10,2	2,51	0,737

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

Dietas: SA, regime controle, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio.

Quadro 16 Efeito da *Nannochloropsis oceanica* nos parâmetros relativos ao sistema digestivo do coelho

Parâmetros	Dieta (n ¹)				DPR ²	Efeito Estatístico
	SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)		
Aparelho digestivo (g)	541,6	544,1	561,2	513,9	62,65	0,415
Aparelho digestivo (g/kg)	196,6	199,4	211,2	194,7	19,40	0,243
Estômago cheio (g)	152,4	156,2	151,7	144,2	24,83	0,765
Estômago cheio (g/kg)	55,1	57,3	56,9	54,4	7,71	0,819
Estômago vazio (g)	28,7	27,7	27,0	27,0	2,76	0,484
Estômago vazio (g/kg)	10,4	10,2	10,2	10,2	0,84	0,877
pH estômago	1,8	1,6	1,6	1,9	0,47	0,283
Ceco cheio (g)	171,6	170,0	184,7	160,1	32,93	0,432
Ceco cheio (g/kg)	62,0	62,2	69,8	60,9	11,96	0,337
Ceco vazio (g)	33,6	32,5	34,6	32,8	3,14	0,456
Ceco vazio (g/kg)	12,3	12,0	13,0	12,4	1,32	0,330
pH ceco	6,1	6,3	6,3	6,2	0,21	0,153

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio.

5. Composição química da carne

A composição das diferentes frações da carne está apresentada no Quadro 17.

Ao serem analisadas as diferentes frações da carne de coelho, em % na matéria original, observou-se que não existiam diferenças significativas (ao nível de $P < 0,05$) para os diferentes grupos na matéria seca, cinza, proteína bruta e gordura bruta. Os resultados para a matéria seca, cinza e proteína estão de acordo com os resultados apresentados por Peiretti e Meineri (2011). Por sua vez a gordura bruta, nesse estudo, apresenta um aumento significativo nos coelhos com dieta com presença de microalga, que se deverá aos teores crescentes de gordura bruta nos regimes com as microalgas, ao contrário do nosso estudo que os regimes

apresentaram teores de gordura bruta idênticos. O estudo conduzido por Dalle Zotte et al. (2012) não encontrou diferenças significativas quer para a cinza, quer para a proteína e para a gordura bruta.

No global a média de matéria seca foi de 25,48%, a média da cinza foi de 1,28%, a média de proteína bruta foi de 20,39% e a média da gordura bruta foi de 2,05%.

Quadro 17 - Efeito da suplementação com *Nannochloropsis oceanica* nas diferentes frações (em % na matéria original) da carne da perna de coelho

	Dieta (n ¹)				DPR ²	Efeito Estatístico
	SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)		
Matéria Seca	25,59	25,51	25,52	25,31	1,293	0,969
Cinza	1,28	1,29	1,27	1,29	0,053	0,805
Proteína Bruta	20,42	20,45	20,16	20,51	0,798	0,765
Gordura Bruta	2,14	1,92	2,14	2,00	0,547	0,770

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio.

6. Perfil de ácidos gordos

Os resultados do perfil dos ácidos gordos e dimetil acetais (DMA), em % do total, e a quantidade de ácidos gordos totais e DMA, em mg/g MS de carne de coelho, encontram-se apresentados no Quadro 18.

A quantidade total de ácidos gordos e DMA presentes na carne de coelho não foi significativamente afetada pela presença de *Nannochloropsis oceanica* na dieta dos animais sendo que, no geral, a média foi de 67,95 mg/g MS de carne.

No grupo dos ácidos gordos saturados houve diferenças significativas apenas no 20:0 (P=0,025). Neste ácido gordo parece haver uma diminuição da sua presença com o aumento de tempo da presença da *Nannochloropsis oceanica* sendo o valor mais elevado o do grupo SA (0,11%) seguido pelo grupo A1 (0,11%), pelo A2 (0,10%) e por fim pelo AA (0,09%).

No grupo dos ácidos gordos monoinsaturados existiu diferenças significativas nos ácidos gordos 17:1 *cis*-9 (P=0,024), 18:1 *cis*-9 (P=0,019) e 20:1 *cis*-11 (P<0,001), existiu, também, uma tendência no ácido gordo 16:1 *cis*-9 (P=0,075). Apesar do ácido gordo 16:1 *cis*-9 não ter um efeito estatístico significativo existe uma tendência para o aumento deste ácido gordo com o aumento do tempo de presença da *Nannochloropsis oceanica*. Por sua vez, ácido gordo 17:1 *cis*-9 mostra um aumento significativo quando há um aumento no período de presença da *Nannochloropsis oceânica* sendo o valor mais baixo o do grupo SA (0,30%) e o valor mais

alto o do grupo AA (0,35%). O ácido gordo 18:1 *cis*-9 parece sofrer uma diminuição significativa com o aumento de tempo de presença da *Nannochloropsis oceanica* sendo o valor mais baixo o do grupo AA (25,06%) seguido do grupo A2 (25,58%), do grupo A1 (27,0%) e por fim do grupo SA (27,55%). O ácido gordo 20:1 *cis*-11 tem uma diminuição muito significativa com o aumento do período de presença de *Nannochloropsis oceanica* sendo que o grupo SA (0,29%) e o grupo A1 (0,27%) são significativamente diferentes do grupo A2 (0,23%) e do grupo AA (0,21%).

No grupo dos ácidos gordos polinsaturados existiu diferenças significativas nos ácidos gordos 20:3 n-9 ($P=0,013$), 20:5 n-3 ($P<0,001$) e 22:5 n-3 ($P<0,001$), existiu, também, uma tendência no ácido gordo 22:6 n-3 ($P=0,060$). O ácido gordo 20:3 n-9 sofre um aumento significativo quando existe a presença de *Nannochloropsis oceanica* na dieta visto que o grupo SA (0,07%) é significativamente diferentes dos restantes grupos, entre estes existe um aumento com o aumento do período em que foi dada a microalga no entanto este aumento não é significativo, no grupo A1 observa-se 0,10% deste ácido gordo, no grupo A2 0,11% e no grupo AA 0,11%. O ácido gordo 20:5 n-3 não foi detetado na carne dos animais alimentados com o regime SA mas estatisticamente igual à do grupo A1 (0,08%), estes grupos tem uma diferença significativa do grupo A2 (0,18%) e são todos significativamente diferentes do grupo AA (0,33%). Estes resultados mostram que a inclusão da *Nannochloropsis oceanica* no regime dos coelhos permitiu aumentar a quantidade do 20:5 n-3 na carne, sendo esse aumento mais expressivo com o aumento do tempo de suplementação. O ácido gordo 22:5 n-3 sofre, também, um aumento muito significativo com o aumento do período de presença da *Nannochloropsis oceanica* na dieta dos animais, sendo o valor mais baixo o do grupo SA (0,09%) seguido, e não significativamente diferente, do grupo A1 (0,15%), seguido do grupo A2 (0,26%) e, por ultimo, o grupo AA (0,48%), o qual é significativamente diferente de todos os restantes grupos. Por fim, existe uma tendência para o aumento do ácido gordo 22:6 n-3 sendo o valor mais baixo o do grupo SA (0,01%) seguido do grupo A2 (0,02%), do grupo A1 (0,02%) e do grupo AA (0,03%), isto leva a crer que a influencia dá-se pela presença da *Nannochloropsis oceanica* na dieta porém não parece que o período em que é dado tenha uma diferença significativa. Estes resultados sugerem que o 20:5 n-3 poderá ser em grande parte convertido em 22:5 n-3, o que explicará o elevado aumento do 22:5 n-3 nos animais alimentados com *Nannochloropsis oceanica* ao longo do tempo de suplementação, e as baixas percentagens de 20:5 n-3.

Quadro 18 Efeito da *Nannochloropsis oceanica* no perfil de ácidos gordos e dimetil acetais (DMA) (em % do total) da carne de coelho e no teor em ácidos gordos totais e DMA (em mg/g MS)) (n.d.- não detetado)

	Dieta (n ¹)				DPR ²	Efeito Estatístico
	SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)		
SFA (% do total AG+DMA)						
10:0	0,10	0,08	0,08	0,09	0,045	0,744
12:0	0,22	0,21	0,21	0,23	0,089	0,925
14:0	2,57	2,56	2,45	2,44	0,349	0,756
iso-15:0	0,06	0,07	0,06	0,07	0,019	0,683
anteiso-15:0	0,08	0,08	0,09	0,09	0,033	0,835
15:0	0,58	0,54	0,56	0,54	0,103	0,825
iso-16:0	0,21	0,22	0,21	0,21	0,058	0,953
16:0	32,68	31,92	31,59	30,94	2,395	0,443
17:0	0,81	0,72	0,78	0,72	0,174	0,539
18:0	9,83	9,23	9,14	9,06	1,202	0,477
20:0	0,11 ^a	0,11 ^a	0,10 ^{ab}	0,09 ^b	0,019	0,025
MUFA (% do total AG+DMA)						
14:1 <i>cis</i> -9	0,46	0,54	0,52	0,59	0,171	0,357
16:1 <i>cis</i> -7	0,32	0,333	0,34	0,32	0,041	0,774
16:1 <i>cis</i> -9	5,69	6,84	6,82	8,01	1,898	0,075
17:1 <i>cis</i> -9	0,30 ^a	0,33 ^{ab}	0,34 ^b	0,35 ^b	0,033	0,024
18:1 <i>cis</i> -9	27,55 ^a	26,96 ^{ab}	25,58 ^{bc}	25,06 ^c	1,892	0,019
18:1 <i>cis</i> -11	2,15	2,18	2,06	2,19	0,239	0,611
20:1 <i>cis</i> -11	0,29 ^a	0,27 ^a	0,23 ^b	0,21 ^b	0,039	<0,001
PUFA (% do total AG+DMA)						
18:2 n-6	12,20	12,80	13,44	13,36	3,341	0,828
18:3 n-3	0,29	0,37	0,39	0,38	0,209	0,699
20:2 n-6	0,21	0,20	0,21	0,17	0,067	0,565
20:3 n-9	0,07 ^b	0,10 ^a	0,11 ^a	0,11 ^a	0,030	0,013
20:3	0,06	0,06	0,06	0,06	0,019	0,697
20:3 n-6	0,19	0,21	0,24	0,22	0,071	0,490
20:4 n-6	1,20	1,33	1,64	1,56	0,486	0,175
20:5 n-3	n.d ^c	0,08 ^c	0,18 ^b	0,33 ^a	0,097	<0,001
22:4 n-6	0,32	0,36	0,39	0,34	0,131	0,584
22:5 n-3	0,09 ^c	0,15 ^{bc}	0,26 ^b	0,48 ^a	0,134	<0,001
22:6 n-3	0,01	0,02	0,02	0,03	0,018	0,060
DMA (% do total AG+DMA)						
DMA 16:0	0,87 ^a	0,76 ^a	1,26 ^b	1,22 ^b	0,272	0,001
DMA 18:0	0,23 ^{ab}	0,19 ^a	0,31 ^c	0,27 ^{bc}	0,073	0,007
DMA 18:1 <i>cis</i> -9	0,26 ^{ab}	0,22 ^b	0,33 ^a	0,27 ^{ab}	0,079	0,029
Total AG+DMA (mg/g MS)	72,11	67,35	62,37	62,97	17,111	0,559

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

a,b,c – Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ao nível de P<0,05.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio

Verificou-se também diferenças significativas nos três DMA detetados na carne. Quanto ao DMA 16:0 parece haver um aumento deste com o aumento de tempo de presença da *Nannochloropsis oceanica* uma vez que os grupos AA (1,22%) e A2 (1,26%) não são significativamente diferentes entre si, no entanto são mais elevados e ambos significativamente diferentes de SA (0,87%) e A1 (0,76%). Quanto ao DMA 18:0 o valor mais elevado é o do grupo A2 (0,31%) que não difere significativamente de AA (0,276%) mas difere significativamente de SA (0,23%) e de A1 (0,19%), no entanto apesar de AA diferir significativamente de A1 não difere de SA. Quanto ao DMA 18:1 cis-9 apesar do efeito estatístico ser significativo este não ocorre entre os grupos SA (0,26%) e AA (0,27%) mas sim entre os grupos A2 (0,33%) e A1 (0,22%) pelo que a diferença não parece estar relacionada com a presença de *Nannochloropsis oceanica*. Os DMA derivam de uma classe particular de fosfolípidos, os plasmalogénios, que se encontram presentes sobretudo membranas celulares, não sendo por isso provenientes da dieta. Os efeitos verificados poderão ser devidos a diferenças no teor de lípidos polares e lípidos neutros da carne, no entanto estes não foram determinados neste estudo.

O estudo conduzido por Dalle Zotte et al. (2014), em que os coelhos eram suplementados com 5% de *Spirulina platensis*, não registou diferenças nos totais de SFA, MUFA, PUFA, ácidos gordos n-6 e ácidos gordos n-3, quando analisado a perna de coelho. Para o corte da perna, também, não foram encontradas diferenças significativas nos ácidos gordos 16:0, 17:0, 18:0, 17:1, 18:3 n-3, 18:3 n-6, 20:5 n-3 (EPA), 22:6 n-3 (DHA) e 20:3 n-6, sendo que não existir diferenças significativas nos ácidos gordos 16:0, 20:5 n-3 (EPA) e 22:6 n-3 (DHA) são resultados contrários aos obtidos neste ensaio.

7. Oxidação lipídica da carne

Os valores referentes à oxidação lipídica da carne foram calculados em mg de MDA/kg carne e estão apresentados no Quadro 19.

Não se verificou qualquer diferença significativa entre os diferentes grupos sendo o valor médio de MDA 0,17, 0,16, 0,18 e 0,15 para os grupos SA, AA, A2 e A1 respetivamente. Este resultado está de acordo pelo registado por Dalle Zotte et al. (2014) em que não foi encontrada qualquer diferença significativa na oxidação lipídica de carne fresca.

Quadro 19 Efeito da presença da *Nannochloropsis oceanica* na oxidação da carne (em mg MDA/ kg carne)

Dieta (n ¹)				DPR ²	Efeito Estatístico
SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)		
0,17	0,15	0,18	0,16	0,081	0,815

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio.

8. Perda de água por cozedura

Os resultados obtidos para a perda de água por cozedura estão apresentados no Quadro 20. Foi verificado uma diferença significativa para a perda de água ($P=0,001$), o grupo A1 (29,92%) foi o grupo com a perda de água mais elevada, sendo significativamente diferente dos restantes grupos, seguido do grupo AA (28,25%), que foi significativamente diferente dos grupos A1 e A2 mas não significativamente diferente do grupo SA, os grupos SA (27,03%) e A2 (26,29%) não tiveram diferenças significativas entre si. Um estudo conduzido por Dalle Zotte et al. (2012) em que os coelhos eram suplementados com 5% de *Spirulina platensis* não registou nenhuma diferença significativa na perda de água por cozedura entre o grupo de controlo e o grupo suplementado com esta microalga.

Quadro 20 Efeito da *Nannochloropsis oceanica* na perda de água da carne por cozedura (%)

Dieta (n ¹)				DPR ²	Efeito Estatístico
SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)		
27,03 ^{bc}	29,92 ^a	26,29 ^c	28,25 ^b	1,738	0,001

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

a,b,c – Médias com letras diferentes diferem significativamente ao nível de $P<0,05$.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio.

9. Cor da carne

Os resultados obtidos referentes à cor da carne de coelho a partir de amostras do músculo *Longissimus lumborum* encontram-se apresentados no Quadro 21.

Os diferentes parâmetros que foram utilizados para avaliar a cor da carne são o L*, correspondente à luminosidade, o a*, correspondente à coordenada vermelho/verde, e o b*, correspondente à coordenada amarelo/azul.

Não foram encontradas diferenças significativas para nenhum dos parâmetros da cor da carne entre os diferentes grupos, sendo que no global dos diferentes grupos a média para o

parâmetro L* foi de 52,93, para o parâmetro a* a média foi de 4,72 e para o parâmetro b* a média foi de -1,05. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por Dalle Zotte et al. (2012) em que coelhos eram suplementados com *Spirulina platensis* não tendo sido registada nenhuma diferença significativa entre os vários parâmetros para a cor da carne.

Quadro 21 Efeito de *Nannochloropsis oceanica* na cor da carne a partir de amostras do *Longissimus lomborum*.

Dieta (n¹)	SA (10)	A1 (10)	A2 (10)	AA (10)	DPR²	Efeito estatístico
L*	53,06	53,40	52,46	52,79	1,650	0,626
a*	4,54	4,63	4,90	4,82	0,731	0,671
b*	-1,16	-0,92	-1,25	-0,85	0,601	0,403

¹n- número de observações (coelhos) em cada dieta.

²DPR- desvio padrão residual.

Dietas: SA, regime controlo, sem microalgas durante 5 semanas; e regime contendo 4,45% de *Nannochloropsis oceanica* durante: AA, 5 semanas; A2, últimas 2 semanas; A1, última semana de ensaio.

Capítulo V – Conclusões e considerações finais

Com base no nosso trabalho experimental podemos concluir que a *Nannochloropsis oceanica* pode ser utilizada como um alimento alternativo, neste caso à da soja integral, na alimentação dos coelhos, sem efeitos significativos marcados nos resultados zootécnicos, na utilização digestiva da dieta, na qualidade da carcaça e na composição global da carne.

No entanto, a digestibilidade da gordura bruta da *Nannochloropsis oceanica* foi inferior à da soja integral.

A digestibilidade aparente dos ácidos gordos insaturados foi superior nos coelhos que ingeriram a dieta com microalga e a digestibilidade do ácido gordo saturado 20:0 foi inferior.

No que se refere aos ácidos gordos da carne da perna foi promovida a inclusão do ácido gordo eicosapentaenóico (EPA) e do ácido gordo docosahexaenóico (DHA).

Existem, também, pontos deste trabalho que poderiam ser aprofundados como a utilização de um maior número de animais e uma diferenciação de níveis de inclusão de microalga. É essencial, também, ter em atenção a componente económica, uma vez que, neste momento, o valor comercial da *Nannochloropsis oceanica* faz com que a sua utilização não seja apelativa para o produtor. Seria, também, interessante a análise sensorial da carne uma vez que seria um dos principais parâmetros que influenciariam o consumidor.

Capítulo VI – Referências bibliográficas

Altomonte, I., Salari, F., Licitra, R., Martini, M., 2018. Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality – A review. *Livestock Science*, 214, 25-35.

Alves, S. P., Mendonça, S.H., Silva, J.L., Bessa, R.J.B., 2018. *Nannochloropsis oceanica*, a novel natural source of rumen-protected eicosapentaenoic acid (EPA) for ruminants. *Scientific Reports*, 8, 1-10.

Alves, S. P., Raundrup, K., Cabo, Â., Bessa, R. J. B., Almeida, A. M., 2015. Fatty Acid Composition of Muscle, Adipose Tissue and Liver from Muskoxen (*Ovibos moschatus*) Living in West Greenland. *Plos One*, 10, 1-21.

Bae, Y.J., Ryu, C., Jeon, J., Park, J., Suh, D.J., Chang, D., Park, Y., 2011. The characteristics of bio-oil produced from the pyrolysis of three marine macroalgae. *Bioresource Technology*, 102, 3512-3520.

Batifoulier, F., Mercier, Y., Gatellier, P. e Renerre, M. (2002). Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. *Meat Science*, 61, 389-395.

Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S., Sánchez-Muniz, F.J., 2009. Characteristics and Nutritional and Cardiovascular-Health Properties of Seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 12, 236-258.

Bonos, E., Kasapidou, E., Kargopoulos, A., Karampampas, A., Christaki, E., Florou-Paneri, P., Nikolakakis, I., 2016. *Spirulina* as a functional ingredient in broiler chicken diets. *South African Journal of Animal Science*, 46, 94-102.

Cavani, C., Petracci, M., Trocino, A., Xiccato, G., 2009. Advances in research on poultry and rabbit meat quality, *Italian Journal of Animal Science*, 8, 741-750

Christaki, E., Florou-Paneri, P., Bonos, E., 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 794–799.

Combes, S., 2004. Valeur nutritionnelle de la viande de lapin. *INRA Production Animales*, 17, 373-383

Combes, S., Dalle Zotte, A., 2005. La viande de lapin : valeur nutritionnelle et particularités technologiques. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris, 29-30 Novembre 2005, 167-180

Cullere, M., Dalle Zotte, A., 2018. Rabbit meat production and consumption: State of knowledge and future perspectives. *Meat Science*, 143, 137-146

Dalle Zotte, A. 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science*, 75, 11–32

Dalle Zotte, A., Szendrő, Z., 2011. The role of rabbit meat as functional food. *Meat Science*, 88, 319–331

Dalle Zotte, A., Sartori, A., Cullere, M., Gerencsér, Z., Matics, Z., Dal Bosco, A., Kovács, M., Szendrő, Z., 2012. Dietary Supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). Part 4: Effect on rabbit carcass and meat quality. In: Proceedings 10th World Rabbit Congress, Sharm El- Sheikh, Egypt, September 3-6, 2012, 949-953

Dalle Zotte, A., Cullere, M., Sartori, A., Szendrő, Z., Kovács, M., Giaccone, V., Dal Bosco, A., 2014. Dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) supplementation to growing rabbits: Effects on raw and cooked meat quality, nutrient true retention and oxidative stability. *Meat Science*, 98, 94-103.

Dlouha, G., Sevcikova, S., Dokoupilova, A., Zita, L., Heindl, J., Skrivan, M., 2008. Effect of dietary selenium sources on growth performance, breast muscle selenium, glutathione peroxidase activity and oxidative stability in broilers. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 265-269.

Douglas, S. E., Raven, J. A., & Larkum, A. W. D., 2003. The Algae and their General Characteristics. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 1–10.

European Commission, 2015. Report from the Commission to the European Parliament and the Council regarding the mandatory indication of the country of origin or place of provenance for milk, milk used as an ingredient in dairy products and types of meat other than beef, swine, sheep, goat and poultry meat. https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/milk/originlabelling/com-2015-205_en.pdf

Evans, A.M., Smith, D.L., Moritz, J.S., 2015. Effects of algae incorporation into broiler starter diet formulations on nutrient digestibility and 3 to 21 d bird performance. *The Journal of Applied Poultry Research*, 24, 206-214

FAOSTAT, 2006 a 2016. Food and agriculture organization of the United Nations. Consultado a 1 de Dezembro de 2018 em <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

Gatrell, S. K., Kim, J., Derksen, T.J., O'Neil, E.V., Lei, X.G., 2015. Creating ω -3 Fatty-Acid-Enriched Chicken Using Defatted Green Microalgal Biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 9315-9322.

Gray, J.I., 1978. Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 55, 539-546

Grinstead, G.S., Tokach, M.D., Dritz, S.S., Goodband, R.D., Nelssen, J.L., 2000. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 83, 237-247.

Guyon, C., Meynier, A., de Lamballerie, M., 2016. Protein and lipid oxidation in meat: A review with emphasis on high pressure treatments. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 131-143.

Harnedy, P. A., FitzGerald, R. J., 2011. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. *Journal of Phycology*, 47, 218-232.

Hasan, M.R., Chakrabarti, R., 2009. Use of Algae and Aquatic Macrophytes as Feed in Small-scale Aquaculture: A Review. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 531. FAO, Rome, Italy.

Hernández, P. e Dalle Zotte, A. (2010). Influence of diet on rabbit meat quality. In C. de Blas & J. Wiseman (Eds.) *Nutrition of the Rabbit*, 2nd Edition, 163-177.

Holdt, S.L., Kraan, S., 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 543-597.

Jung, K.A., Lim, S., Kim, Y., Park, J.M., 2013. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource Technology*, 135, 182-190.

Kang, H.K., Salim, H.M., Akter, N., Kim, D.W., Kim, J.H., Bang, H.T., Kim, M.J., Na, J.C., Hwangbo, J., Choi, H.C., Suh, O.S., 2013. Effect of various forms of dietary *Chlorella* supplementation on growth performance, immune characteristics, and intestinal microflora population of broiler chickens. *The Journal of Applied Poultry Research*, 22, 100-108.

Kumar, B. R., Deviram, G., Mathimani, T., Duc, P.A., Pugazhenhi, A., 2019. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 583-588.

Lee, S.A., Whenham, N., Bedford, M.R., 2019. Review on docosahexaenoic acid in poultry and swine nutrition: Consequence of enriched animal products on performance and health characteristics. *Animal Nutrition*, 5, 11-21.

Liu, J., Song, Y., Qiu, W., 2017. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72, 154-162

Love, J. D., Pearson, A. M., 1971. Lipid Oxidation in Meat and Meat Products - A Review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48, 547-549.

Madeira, M.S., Cardoso, C., Lopes, P.A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N.M., Prates, J.A.M., 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review. *Livestock Science*, 205, 111-121.

Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., Giger-Reverdin, S., Lessire, M., Lebas, F., Ankers, P., 2016. Seaweeds for livestock diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 212, 1-17.

Marcilla, A., Gómez-Siurana, A., Gomis, C., Chápuli, E., Catalá, M. C., Valdés, F. J., 2009. Characterization of microalgal species through TGA/FTIR analysis: Application to *nannochloropsis* sp. *Thermochimica Acta*, 484, 41-47

Mariutti, L. R. B., Braganolo, N., 2017. Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. *Food Research International*, 94, 90-100.

Martins, D. A., Custódio, L., Barreira, L., Pereira, H., Ben-Hamadou, R., Varela, J., Abu-Salah, K.M., 2013. Alternative Sources of n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Microalgae. *Marine Drugs*, 11, 2259-2281.

Meng, Y., Jiang, J., Wang, H., Cao, X., Xue, S., Yang, Q., Wang, W., 2015. The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. *Bioresource Technology*, 179, 483-489.

Mordenti, A.L., Sardi, L., Bonaldo, A., Pizzamiglio, V., Brogna, N., Cipollini, I., Tassinari, M., Zaghini, G., 2010. Influence of marine algae (*Schizochytrium* spp.) dietary supplementation on doe performance and progeny meat quality. *Livestock Science*, 128, 179-184.

Oh, S.T., Zheng, L., Kwon, H.J., Choo, Y.K., Lee, K.W., Kang, C.W., An, B.K., 2015. Effects of dietary fermented *Chlorella vulgaris* (CBT) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks. *Asian Australas. Journal of Animal Science*, 28, 95-101.

Pateiro, M., Barba, F. J., Domínguez, R., Sant'Ana, A. S., Khaneghah, A. M., Gavahian, M., Gómez, B., Lorenzo, J. M., 2018. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 113, 156–166.

Peiretti, P.G., Meineri, G., 2008. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. *Livestock Science*, 118, 173-177.

Peiretti, P.G., Meineri, G., 2011. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. *Livestock Science*, 140, 218-224.

Petracci, M., Bianchi, M., Cavani, C., 2009. Development of rabbit meat products fortified with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Nutrients*, 1, 111-118.

Rezvani, M., Shivazad, M., Zaghari, M., Moravej, H., 2012. A survey on *Chlorella vulgaris* effect's on performance and cellular immunity in broilers. *International Journal of Agricultural Research*, 3, 1.

Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., Naim, R., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394-404.

Sandnes, J.M., Kallqvist, T., Wenner, D., Gislerod, H.R., 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 17, 515-525.

Sardi, L., Martelli, G., Lambertini, L., Parisini, P., Mordenti, A., 2006. Effects of a dietary supplement of DHA-rich marine algae on Italian heavy pig production parameters. *Livestock Science*, 103, 95-103.

Silva, F.A., Borges, M.F. e Ferreira, M.A., 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22, 94-103.

Simkus, A., Simkiene, A., Cernauskiene, J., Kvietkute, N., Cernauskas, A., Paleckaitis, M., Kerziene, S., 2013. The effect of blue algae *Spirulina platensis* on pig growth performance and carcass and meat quality. *Veterinarija ir zootechnika*, 61, 70-74.

Skrede, A., Mydland, L. T., Ahlstrom, O., Reitan, K.I., Gislerod, H.R., Overland, M., 2011. Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20, 131-142.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.

Suda, S., Atsumi, M., Miyashita, H., 2002. taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia*, 41, 273-279.

Tres, A., Magrinyà, N., Bou, R., Guardiola, F., Nuchi, C.D., Codony, R., 2014. Impact of the oxidative quality of fish oils in feeds on the composition and oxidative stability of chicken and rabbit meat. *Animal Feed Science and Technology*, 196, 76-87.

Tůmová, E., Bízková, Z., Skřivanová, V., Chodová, D., Martinec, M., Volek, Z., 2014. Comparisons of carcass and meat quality among rabbit breeds of different sizes, and Hybrid rabbits. *Livestock Science*, 165, 8-14

Xiao, Y., Cui, J.Z.J., Feng, Y., Cui, Q., 2013. Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, 130, 731-738.

Xiccato, G., 1999. Feeding and meat quality in rabbits: a review. *World Rabbit Science*, 7, 75-86.

Yan, L., Lim, S.U., Kim, I.H., 2012. Effect of fermented *Chlorella* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbial and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 1742-1747

Yan, L. and Kim, I.H., 2013. Effects of dietary ω -3 fatty acid-enriched microalgae supplementation on growth performance, blood profiles, meat quality, and fatty acid composition of meat in broilers. *Journal of Applied Animal Research*, 4, 392-397.

Anexos

Anexo I

Ficha Técnica da *Nannochloropsis oceanica* (fornecida por Allmicroalgae - Nature Products, SA).



Allmicroalgae
natural products

Certificate of Analysis

Product Specifications

Type:	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	Origin:	Algafarm, Portugal
Production:	Closed system	Processing:	Gently spray dried powder
Production Date:	August 2015	Expiration Date:	August 2018
Lot 201540221			

Analysis Results

	Results	Units	Methodology
Nutrients			
Total Lipids	15,8	g/100g	Soxhlet
Protein	38,3	g/100g	Kjeldahl
Ash	13,4	g/100g	Burning at 525°C
Moisture	3,0	g/100g	Drying at 105°C
Sodium	4,7	g/100g	Digestion / AAS
Fatty Acids			
EPA (% of Lipids)	30,2	%	Extraction / GC-FID
Pigments			
Chlorophyll	2876	mg/100g	Extraction / HPLC
Total Carotenoids	828	mg/100g	Extraction / HPLC

Microbiological Specifications

Aerobic Plate total counts 30°C	1,5x10 ⁴	cfu/g	ISO 4833:2003 ISO 4833-1:2013
<i>E. coli</i>	Not Detected		ISO 16649-2:2001
<i>Vibrio</i> spp.	Neg. 25g		ISO/TS 21872-2:2007
Yeasts	<1x10 ⁴	cfu/g	ISO 21527-2:2008
Moulds	<1x10 ⁴	cfu/g	ISO 21527-2:2008
Heavy Metals			
Lead	0,10	mg/kg	Digestion / AAS
Cadmium	0,26	mg/kg	Digestion / AAS
Mercury	<0,10	mg/kg	Digestion / AAS
Arsenic	0,41	mg/kg	Digestion / AAS
Tin	<2,00	mg/kg	Digestion / GC

Pataias, 26-12-2016

Quality Assurance

Production Manager



Allmicroalgae - Nature Products SA. Avenida das Forças Armadas, 125; 1600 Lisboa, Portugal; Ph: +351 217927100; E-mail: info@allmicroalgae.com